

# **Evolution der Pyrrolizidinalkaloidbiosynthese- Untersuchungen an Vertretern der Boraginaceae**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Andreas Reimann  
aus Clausthal-Zellerfeld

1. Referent: Prof. Dr. Dietrich Ober

2. Referent: Prof. Dr. Thomas Hartmann

eingereicht am: 29.10.2007

mündliche Prüfung (Disputation) am: 19.02.2008

Druckjahr 2008

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen**

Andreas Reimann, Niknik Nurhayati, Anita Backenköhler, and Dietrich Ober:  
Repeated Evolution of the Pyrrolizidine Alkaloid-Mediated Defense System in Separate Angiosperm Lineages. *The Plant Cell*, Vol. 16, 2772-2784, October 2004

### **Tagungsbeiträge**

Reimann, A., Nurhayati, N., Hartmann, T., Ober, D.: The Polyphyletic Origin of Homospermidine Synthase, the Entry Enzyme of Pyrrolizidine Alkaloid Biosynthesis. Botanikertagung 2002, Freiburg i. Br., 22. – 27. September 2002

Homospermidine Synthase as the Entry Enzyme of Pyrrolizidine Alkaloid Biosynthesis – is it of Polyphyletic or Monophyletic Origin?

4. Kurt-Mothes-Doktoranden-Workshop, Jena, 3. – 5. Oktober 2002

Daniel Niemüller, Andreas Reimann, Dietrich Ober: The Polyphyletic Origin of Pyrrolizidine Alkaloid Biosynthesis – Comparative Localisation of Homospermidine Synthase within Boraginaceae. Botanikertagung 2004, Braunschweig

## **Danksagung**

An erster Stelle danke ich all denen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben, dabei insbesondere:

Herrn Prof. Dr. Dietrich Ober für die interessante Themenstellung, die Unterstützung bei der Planung der Arbeit und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Thomas Hartmann für die Übernahme des Zweitgutachtens und seine Unterstützung während der Promotionszeit.

Weiterhin bei allen Kolleginnen und Kollegen des Institutes für Pharmazeutische Biologie für Ihre Hilfsbereitschaft und freundliche Zusammenarbeit.

**Für Ines**



## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung .....	1
1.1	Pyrrolizidinalkaloide (PAs).....	2
1.2	Die Bedeutung der Homospermidinsynthase (HSS) in der Biosynthese von PAs .....	5
1.3	Evolutiver Ursprung der HSS aus der Desoxyhypusinsynthase (DHS).....	5
1.4	Die Pflanzenfamilie der Boraginaceae .....	8
1.5	Zielsetzung der Arbeit .....	8
2.	Material und Methoden .....	9
2.1	Chemikalien .....	9
2.2	Pflanzenmaterial und Pflanzenanzucht .....	9
2.2.1	<i>Cynoglossum officinale</i> (Boraginaceae).....	9
2.2.2	<i>Heliotropium indicum</i> (Boraginaceae) .....	10
2.2.3	<i>Symphytum officinale</i> (Boraginaceae).....	10
2.2.4	<i>Petasites hybridus</i> (Asteraceae/Senecioneae) .....	11
2.2.5	<i>Eupatorium cannabinum</i> (Asteraceae/Eupatorieae).....	12
2.3	Wirtsstämme von <i>Escherichia coli</i> .....	12
2.3.1	Kulturbedingungen .....	12
2.3.2	<i>E. coli</i> TOP 10 (Invitrogen).....	13
2.3.3	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> (Invitrogen) und <i>E. coli</i> XL1 Blue (Stratagene) .....	14
2.3.4	<i>E. coli</i> BL21(DE3) (Invitrogen) .....	14
2.4	Plasmide/Vektoren .....	14
2.5	Molekularbiologische Methoden.....	15
2.5.1	Extraktion von Nukleinsäuren.....	15
2.5.1.1	RNA-Extraktion mit RNeasy <sup>TM</sup> Plant Mini Kit .....	15
2.5.1.2	Extraktion genomischer DNA .....	16
2.5.1.2.1	Extraktion genomischer DNA mit DNeasy <sup>TM</sup> Plant Mini Kit.....	16
2.5.1.2.2	Extraktion genomischer DNA mit Plant DNazol <sup>®</sup> Reagenz .....	16
2.5.1.3	Extraktion von Plasmid-DNA .....	17
2.5.1.4	Reinigung von DNA aus Agarose-Gelen .....	19
2.5.1.5	Reinigung von PCR- und Restriktionsprodukten.....	19
2.5.2	Präzipitation von Nukleinsäuren .....	20
2.5.2.1	Präzipitation von DNA.....	20
2.5.3	Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen .....	20

2.5.4	Herstellung von cDNA .....	21
2.5.5	Primer.....	22
2.5.5.1	Entwurf degenerierter Primer .....	22
2.5.5.2	Entwurf genspezifischer Primer.....	23
2.5.6	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	23
2.5.6.1	Standard-PCR .....	23
2.5.6.2	Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)-PCR .....	26
2.5.7	RT-PCR .....	27
2.5.8	Inverse-PCR.....	27
2.5.9	PCR genomischer DNA zur Analyse der Exon-Intron-Struktur .....	30
2.5.10	Elektrophoretische Trennung und Detektion von DNA und RNA .....	30
2.5.10.1	Restriktionsverdau .....	31
2.5.11	Klonierung von PCR-Produkten.....	32
2.5.11.1	Klonierung in TOPO Vektoren.....	32
2.5.11.2	Klonierung in Expressionsvektoren pET3a/pET3a-mod.....	33
2.5.12	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen.....	35
2.5.12.1	Präparation kompetenter Zellen.....	35
2.5.12.2	Transformation kompetenter Zellen .....	35
2.5.13	Selektion positiver rekombinanter Klone .....	36
2.5.13.1	Blau/Weiß Selektion .....	37
2.5.13.2	PCR-Kolonie-Screening .....	37
2.5.14	Heterologe Expression pflanzlicher cDNAs in <i>E. coli</i> .....	39
2.5.14.1	Gewinnung des heterolog exprimierten Proteins.....	40
2.5.14.2	Klonierung und Expression von His-tag-markierten Proteinen.....	40
2.6	Sequenzierung.....	41
2.7	Proteinchemische Methoden.....	42
2.7.1	Quantifizierung von Proteinen.....	42
2.7.2	Umpuffern, Entsalzen und Fällen von Proteinen.....	42
2.7.3	Herstellen von SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE).....	43
2.7.4	Proteinfärbungen.....	44
2.7.4.1	Coomassie Färbung.....	44
2.7.4.2	Indian Ink Färbung.....	45
2.7.5	His-Tag-Reinigung .....	45
2.7.6	Enzymassays.....	46



2.7.6.1	HSS-Assay.....	47
2.7.6.2	DHS-Assay.....	48
2.8	Immunologische Methoden.....	49
2.8.1	Immunisierung.....	49
2.8.2	Western-Blot .....	49
2.9	Radiochemische Untersuchungen .....	52
2.9.1	Tracerversuche mit Frischpflanzen .....	52
2.10	Computerunterstützte Sequenzanalyse.....	54
2.11	Promotorsequenzanalyse.....	55
2.11.1	Matrizenbasierte Sequenzanalyse unter Verwendung von "patser matrices".....	55
2.11.1.1	Sequenzvergleichende Promotor-Analyse mit dem Programm "consensus" .....	57
3.	Ergebnisse.....	58
3.1	Boraginaceae .....	59
3.1.1	<i>Cynoglossum officinale</i> .....	59
3.1.1.1	Identifikation der cDNAs, die für die HSS und DHS aus <i>Cynoglossum officinale</i> codieren.....	59
3.1.1.1.1	Ergebnisse der PCRs mit degenerierten Primern .....	59
3.1.1.1.2	5`- und 3`-RACE .....	61
3.1.1.1.3	Proteinüberexpression .....	63
3.1.1.1.4	Klonierung und Expression von 6x His-markiertem Protein .....	65
3.1.1.2	Transkriptionsanalyse der HSS und DHS in unterschiedlichen Geweben von <i>Cynoglossum officinale</i> .....	67
3.1.1.3	Western-Blot .....	72
3.1.2	<i>Heliotropium indicum</i> .....	74
3.1.2.1	Identifikation der für die HSS und DHS aus <i>Heliotropium indicum</i> codierende cDNA .....	74
3.1.2.1.1	PCR mit degenerierten Primern.....	74
3.1.2.1.2	5`- und 3`-Race.....	75
3.1.2.1.3	Proteinüberexpression .....	77
3.1.2.2	Transkriptionsanalyse der HSS und DHS in unterschiedlichen Pflanzengeweben von <i>Heliotropium indicum</i> .....	79
3.1.3	<i>Symphytum officinale</i> .....	83

3.1.3.1	Identifikation der cDNA die für die HSS und DHS aus <i>Symphytum officinale</i> codiert.....	83
3.1.3.1.1	Ergebnisse der PCRs mit degenerierten Primern.....	83
3.1.3.1.2	5'- und 3'-Race .....	84
3.1.3.1.3	Proteinüberexpression.....	86
3.1.3.2	Transkriptionsanalyse der HSS und DHS in unterschiedlichen Pflanzengewebe von <i>Symphytum officinale</i> .....	88
3.1.3.3	Western-Blot.....	90
3.1.3.4	Tracerversuche an Blättern von <i>S. officinale</i> .....	92
3.2	Asteraceae.....	94
3.2.1	<i>Petasites hybridus</i> (Senecioneae) .....	94
3.2.1.1	Identifikation der cDNA die für die HSS und DHS aus <i>Petasites hybridus</i> codiert.....	94
3.2.1.1.1	PCR mit degenerierten Primern .....	94
3.2.1.1.2	5' und 3' Race .....	95
3.2.1.1.3	Proteinüberexpression.....	97
3.2.1.2	Transkriptionsanalyse der HSS und DHS in unterschiedlichen Pflanzengewebe von <i>Petasites hybridus</i> .....	98
3.3	Biochemische Charakterisierung der Proteine zur Identifikation der cDNAs, die für eine HSS oder DHS codieren.....	101
3.4	Phylogenetischer Baum .....	103
3.5	PCR mit genomischer DNA .....	103
3.5.1	Exon-Intron-Struktur .....	104
3.5.2	Inverse PCR.....	108
3.5.2.1	Bioinformatische Promotoranalyse.....	110
4.	Diskussion.....	112
4.1.1	Biochemische Charakterisierung.....	112
4.1.1.1	Die biochemischen Funktionen des DHS-HSS Systems .....	112
4.1.1.2	Die biochemischen Eigenschaften der HSS.....	113
4.1.2	Die Phylogenie von DHS und HSS .....	115
4.1.2.1	Genduplikationen des <i>dhs</i> -Gens .....	119
4.1.3	Transkriptionsorte in den untersuchten Pflanzen.....	120
4.1.4	Einschätzung der bioinformatischen Promotoranalyse.....	124
4.1.5	Ausblick .....	125

---

5. Zusammenfassung .....	127
6. Literaturverzeichnis .....	129
7. Anhang .....	142

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Die fünf Strukturklassen der Pyrrolizidinalkaloide (PAs) .....	2
Abb. 1.2:	Gegenüberstellung der Reaktionsmechanismen von Desoxyhypusinsynthase (DHS, EC 2.5.1.46) (A) und der pflanzlichen Homospermidinsynthase (HSS, EC 2.5.1.45) (B). .....	6
Abb. 1.3:	Evolutionäre Entstehung der HSS durch Duplikation des DHS-codierenden Gens und anschließendem Verlust der DHS-Aktivität .....	7
Abb. 2.1:	Schematische Darstellung der Inversen PCR an einem Beispiel, bei dem es um die Identifizierung einer potentiellen Promotorregion geht.....	28
Abb. 2.2:	Biosynthese von PAs am Beispiel von Senecionin <i>N</i> -Oxid.....	52
Abb. 3.1:	Metallchelataffinitätschromatografie der rekombinanten HSS aus <i>C. officinale</i> .....	67
Abb. 3.2:	Darstellung der für die RT-PCR verwendeten Pflanzenorgane von <i>C. officinale</i> .....	68
Abb. 3.3:	Quantitative Analyse der Gesamt-RNAs aus verschiedenen Organen von <i>C. officinale</i> und deren vergleichend durchgeführte RT-PCR der HSS und DHS.....	69
Abb. 3.4:	Darstellung der für die RT-PCR verwendeten Pflanzenorgane von <i>C. officinale</i> -Keimlingen.....	71
Abb. 3.5:	Quantitative Analyse der Gesamt-RNAs aus verschiedenen Organen von <i>C. officinale</i> -Keimlingen und deren vergleichend durchgeführte RT-PCR der HSS und DHS .....	72
Abb. 3.6:	Western-Blot von Vegetationskegeln verschieden alter <i>C. officinale</i> - Keimlinge.....	73
Abb. 3.7:	Die für die RT-PCR verwendeten Pflanzenorgane von <i>H. indicum</i> .....	79
Abb. 3.8:	Quantitative Analyse der Gesamt-RNAs aus verschiedenen Organen von <i>H. indicum</i> und deren vergleichend durchgeführte RT-PCR der HSS und DHS.....	80
Abb. 3.9:	Quantitative Analyse der Gesamt-RNAs aus verschiedenen Organen des Blütenstandes von <i>H. indicum</i> und deren vergleichend durchgeführte RT- PCR der HSS und DHS.....	82
Abb. 3.10:	Darstellung der für die RT-PCR verwendeten Pflanzenorgane von <i>S. officinale</i> aus dem Arzneipflanzengarten.....	88

Abb. 3.11:	Quantitative Analyse der Gesamt-RNAs aus verschiedenen Organen des Blütenstandes von <i>S. officinale</i> und deren vergleichend durchgeführte RT-PCR der HSS und DHS .....	89
Abb. 3.12:	Western-Blot junger Blätter von <i>S. officinale</i> .....	91
Abb. 3.13:	Rapid Intelligence TLC Analyser (RITA)-Chromatogramme .....	93
Abb. 3.14:	Darstellung der für die RT-PCR verwendeten Pflanzenorgane von <i>P. hybridus</i> .....	99
Abb. 3.15:	Quantitative Analyse der Gesamt-RNAs aus verschiedenen Organen von <i>P. hybridus</i> und deren vergleichend durchgeführte RT-PCR der HSS und DHS .....	100
Abb. 3.16:	Überexpression der rekombinanten und gereinigten HSS und DHS aus <i>H. indicum</i> , <i>C. officinale</i> , <i>S. officinale</i> und <i>P. hybridus</i> .....	101
Abb. 3.17a:	Anzahl und Längen der Exons und Introns sowie die Intronphasen (IP) der aufgeführten <i>hss</i> - und <i>dhs</i> -Gene unterschiedlicher Organismen .....	106
Abb. 3.17b:	Vergleich der Exon- und Intronstrukturen von <i>hss</i> - und <i>dhs</i> -Genen unterschiedlicher Organismen .....	107
Abb. 4.1:	„Unrooted Maximum Likelihood Tree“ basierend auf 23 HSS- und DHS-codierender cDNA-Sequenzen verschiedener Angiospermen Arten. ....	116

**Abkürzungsverzeichnis**

AAP	Abridged Anchor Primer
A/Abs.	Absorption
Abb.	Abbildung
Abs.	Absolut
AK	Antikörper
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AUAP	Abridged Universal Anchor Primer
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw	beziehungsweise
ca.	cirka
cDNA	komplementäre DNA
<i>C. officinale</i>	<i>Cynoglossum officinale</i>
DC	Dünnschichtchromatographie
dCTP	desoxy-Cytidin-triphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
d.h.	das heißt
DHM	Desoxyhypusin-Monooxygenase
Dhyp	Desoxyhypusin
DHS/ <i>dhs</i>	Desoxyhypusin-Synthase/ <i>kursiv</i> : auf ihr Gen bezogen
DMPC	Dimethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleosid-triphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
eiF5A	eukaryontischer Initiationsfaktor 5A
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. cannabinum</i>	<i>Eupatorium cannabinum</i>
Fa.	Firma
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
GSP	genspezifischer Primer
<i>H. indicum</i>	<i>Heliotropium indicum</i>

His	Histidin
HSS/ <i>hss</i>	Homospermidin-Synthase/ <i>kursiv</i> : auf ihr Gen bezogen
Hyp	Hypusin
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaar
kDA	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
Lsg.	Lösung
Lys	Lysin
max.	maximal
mCi	Millicurie
mod	modifiziert
mRNA	„messenger“-Ribonukleinsäure
MSOH	Murashige und Skoog-Medium ohne Hormon
m/v	Masse pro Volumen
MW	Molekulargewicht
Ni-NTA	Nickel-Nitrilo-Tri-Essigsäure (Chelatkomplex)
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
OD	Optische Dichte
PA	Pyrrolizidin-Alkaloid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	„Phosphate-buffered saline“
PBS-T	„Phosphate-buffered saline“ mit 0,1 % Tween 20
<i>Phalaenopsis spec.</i>	<i>Phalaenopsis Species</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>P. hybridus</i>	<i>Petasites hybridus</i>
Put	Putrescin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	reverse Transkription

<i>S. vernalis</i>	<i>Senecio vernalis</i>
s.	siehe
s.o.	siehe oben
<i>S. officinale</i>	<i>Symphytum officinale</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNO	Senecionin- <i>N</i> -Oxygenase
Tab.	Tabelle
TBS	„Tris-buffered saline“
TBS-T	„Tris-buffered saline“ mit 0,1 % Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV-Licht	Ultraviolett-Licht
Vgl.	vergleiche
Vis-Licht	sichtbares Licht
VT	Volumenteil
v/v	Volumen pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indol- $\beta$ -D-Galaktopyranosid

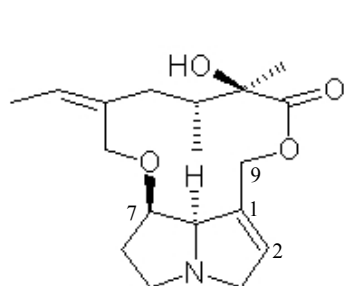


## 1. Einleitung

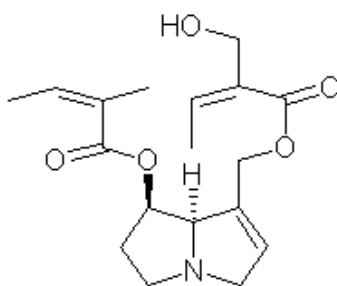
Im Laufe der Evolution hat sich in den Pflanzen der für sie charakteristische Sekundärstoffwechsel entwickelt, der eine Vielzahl chemisch sehr unterschiedlicher Verbindungen produziert. Im Gegensatz zu den Produkten des Primärstoffwechsels ist die Funktion vieler Sekundärstoffe bislang noch nicht eindeutig geklärt. Von diesen Sekundärstoffen, die zum Teil sehr komplexe Strukturen aufweisen, sind bereits über 100.000 charakterisiert (WINK, 1988). So weisen sowohl MOTHES (1955) und LUCKNER (1990) darauf hin, dass die Produkte des Sekundärstoffwechsels aufgrund ihrer strukturellen Vielfalt Abfallprodukte des Primärstoffwechsels darstellen und keine physiologische Bedeutung für die Pflanze haben könnten. HASLAM (1986) schreibt den Sekundärstoffen eine später erlangte Funktion für die Pflanze zu, die durch die Überproduktion der Primärstoffe entstanden sein könnte. Die heute allgemein akzeptierte Theorie beschreibt, dass sich die Sekundärstoffe während der Evolution durch den permanenten Selektionsdruck einer feindlichen Umwelt als nützlich für das Überleben der Pflanze erwiesen, und sich weiter optimiert und schließlich genetisch konserviert haben. Unterstützt wird diese These dadurch, dass Sekundärstoffe im Gegensatz zu den Primärstoffen wie Zucker, Fette und Eiweiße, entbehrlich für Wachstum und Entwicklung der Pflanze sind. Andererseits sind Sekundärstoffe unentbehrlich für die Erhaltung der Art im Ökosystem (SWAIN, 1977; HARTMANN, 1985; HARBORNE, 1993). Erst durch den Selektionsdruck in den sich ständig verändernden Ökosystemen, konnten sich die Pflanzen aufgrund der enormen Vielfalt ihrer Sekundärstoffe durchsetzen (HARTMANN, 1996), wie die Anpassung der Pflanze an bestimmte Standortfaktoren z.B. Trockenheit, hohe Salzkonzentrationen oder hohe Schwermetallkonzentrationen (PICHESKY und GANG, 2000; HARBORNE, 2001) belegt. Als weitere wichtige Funktionen in der Ökologie der Pflanzen haben sich aufgrund ihrer sessilen Lebensweise Sekundärstoffe als Verteidigungsmechanismen gegen Herbivoren entwickelt. Eine vielseitige Klasse dieser Sekundärstoffe stellen die Pyrrolizidin-Alkaloide (PAs) dar. Die PAs sind in der jüngsten Zeit durch biochemische, physiologische, chemoökologische Untersuchungen gut charakterisiert worden (HARTMANN und WITTE, 1995; FRÖLICH, 1996; JENETT-SIEMS *et al.*, 1998). Untersuchungen belegen, dass sich während der Evolution die PAs zu einer Stoffgruppe biologisch wirksamer Substanzen entwickelt haben (HARTMANN, 1987).

## 1.1 Pyrrolizidinalkaloide (PAs)

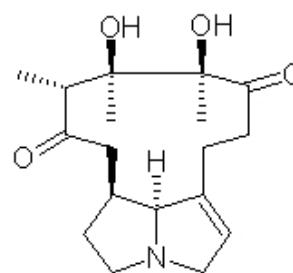
Pyrrolizidin-Alkaloide (PAs) sind typische pflanzliche Sekundärstoffe und konnten bisher nur in Angiospermen nachgewiesen werden. PAs werden von den Pflanzen konstitutiv als Abwehrstoffe gegen Herbivoren produziert (HARTMANN, 1999; HARTMANN und OBER, 2000; OBER *et al.*, 2003). Innerhalb der Angiospermen kommen die PAs nur sehr sporadisch in einigen nicht nahe miteinander verwandten Familien vor. Etwa 95 % der mehr als 400 bekannten Strukturen wurden in der Familie der Asteraceae (Tribus Eupatorieae und Tribus Senecioideae), einigen Gattungen der Boraginaceae und der Apocynaceae, in der Gattung *Crotalaria* (Fabaceae) und in einigen Gattungen der Orchidaceae gefunden. Darüberhinaus weisen einzelne Arten innerhalb der Familien Celastraceae, Convolvulaceae und Ranunculaceae ebenfalls PAs auf (HARTMANN und WITTE, 1995).



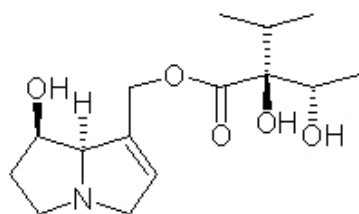
Senecionin-Typ (> 100)  
Asteraceae (Senecioideae)



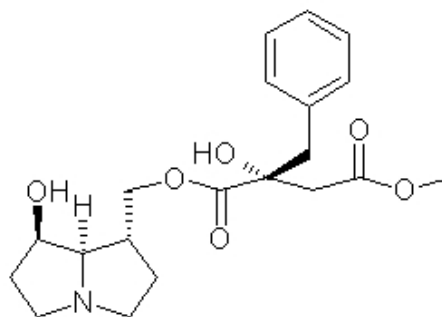
Triangularin-Typ (> 50)  
Asteraceae (Senecioideae)



Monocrotalin-Typ (> 50)  
Fabaceae



Lycopsamin-Typ (> 100)  
Asteraceae (Eupatorieae)  
Boraginaceae



Phalaenopsin-Typ (> 100)  
Orchidaceae

**Abb. 1.1: Die fünf Strukturklassen der Pyrrolizidinalkaloide (PAs)** (HARTMANN und WITTE, 1995). Die Zahlen in den Klammern liefern eine Größenordnung über die Anzahl an bisher bekannten Einzelstrukturen.

Das charakteristische Grundgerüst eines PA-Moleküls besteht aus einer Necin-Base, welche mit einer oder mehreren Necin-Säuren verestert ist. Dabei können sowohl offenkettige Mono-

und Diester sowie makrozyklische Diester entstehen. Das jeweils häufig artspezifische PA-Muster, wird durch geringfügige chemische Modifikationen an der Basen- und Säureinheit der PA-Grundstruktur erreicht. Nach HARTMANN und WITTE (1995) werden PAs in fünf unterschiedliche Strukturklassen eingeteilt (Abb. 1). In den Asteraceae, den Boraginaceae und den Fabaceae liegen die PAs überwiegend als *N*-Oxide vor. Während sie in *Phalaenopsis spec.* (Orchidaceae) nur teilweise als *N*-Oxide vorliegen, kommen sie innerhalb der Convolvulaceae als basische tertiäre Alkaloide vor (FRÖLICH, 1996; JENETT-SIEMS *et al.*, 1998). Ebenfalls in ihrer basischen tertiären Form kommen die PAs in den trockenen und wasserarmen Samen von *Crotalaria* (Fabaceae) vor (HARTMANN und WITTE 1995).

PAs werden in der Pflanze in unterschiedlichen Organen gebildet, wobei der Bildungsort unabhängig von der Pflanzenfamilie ist. Tracerexperimente an Wurzelorgankulturen sowie an verschiedenen Asteraceae-Pflanzen zeigten, dass die PA-Biosynthese ausschliesslich in der Wurzel lokalisiert ist (TOPPEL *et al.*, 1987; HARTMANN *et al.*, 1989; HARTMANN 1994). Dabei wies die Wurzelspitze die höchste Biosyntheseaktivität auf. Da an der Wurzelspitze die höchste Wachstumsaktivität vorhanden ist, ist ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen Biosyntheseaktivität der PAs und des Wurzelwachstums sehr wahrscheinlich (SANDER und HARTMANN, 1989). Hier könnte das Polyamin Spermidin, welches als Wachstumsfaktor diskutiert wird, wahrscheinlich eine Rolle spielen (HARTMANN *et al.*, 1988; GRASER und HARTMANN, 2000).

Innerhalb einer PA-produzierenden Pflanze sind die Alkaloidmengen organ- und gewebespezifisch verteilt. In den Blütenköpfen von *Senecio vulgaris* wurden bis zu 80 % der gesamten, in der Pflanze nachweisbaren PAs gefunden. Das entsprach einer 30-fach höheren Konzentration in den reproduktiven Geweben als in den vegetativen Organen der Pflanzen (HARTMANN und ZIMMER, 1986). Bei genauerer Untersuchung der vegetativen Organe zeigte sich eine erhöhte Konzentration an PAs in den äußeren epidermalen Zellschichten (HARTMANN *et al.*, 1989). Auch in anderen Pflanzen zeigte sich, dass die Blüten der Hauptspeicherort für PAs sind, wogegen die Verteilung in den vegetativen Organen variieren kann (BILLER *et al.*, 1994; Van DAM *et al.*, 1995; FRÖLICH, 1996). Diese spezifische PA-Verteilung innerhalb der Pflanzen stellt einen wirkungsvollen Schutz ihrer reproduktiven Organe vor Frassfeinden dar. Ein Weg der Verteilung konnte *in vitro* mit Hilfe radioaktiver Tracer-Studien an Wurzelkulturen und Zellkulturen sowie an intakten Pflanzen der Gattung *Senecio* gefunden werden. Das ausschließlich in der Wurzel synthetisierte Senecionin *N*-Oxid wird exklusiv und spezifisch über das Phloem in die oberirdischen Organe transportiert. Für das Be- und Entladen des Phloems werden spezifische Carrier vermutet, da PA-freie Pflanzen nicht in der Lage sind, diese über

das Phloem zu transportieren (HARTMANN *et al.*, 1989). Für den Transport in die Vakuole wurden bereits Carrier beschrieben (EHMKE *et al.*, 1988). Die Speicherung der Alkaloide in der Vakuole erfolgt in Form ihrer *N*-Oxide. Radioaktive Fütterungsversuche an Wurzelorganokulturen und intakten Pflanzen der Gattung *Senecio* belegten, dass PAs keinem signifikanten Abbau unterlagen, sondern langsam und kontinuierlich in das artspezifische Alkaloidspektrum diversifiziert wurden (HARTMANN und TOPPEL, 1987; HARTMANN *et al.*, 1988; SANDER und HARTMANN, 1989).

PAs werden in den verschiedenen Pflanzenfamilien in unterschiedlichen Organen synthetisiert. Erfolgreiche Fütterungsexperimente an isolierten Sprossen der Gattung *Crotalaria* aus der Familie der Fabaceae lassen den Schluss zu, dass die PA-Biosynthese im Spross lokalisiert ist, da die Fütterungsexperimente an verschiedenen Wurzelorgan- und Zellkulturen keine Aktivität zeigten (NOWACKI und BYERRUM, 1962; HARTMANN 1994). In der Orchidaceae *Phalaenopsis spec.* findet die PA-Biosynthese nur in den Luftwurzelspitzen und den Knospen statt (FRÖLICH, 1996).

Die PAs mit einer Doppelbindung in 1,2-Position, einer veresterten allylischen Hydroxyl-Gruppe an Position 9 und der freien oder veresterten Hydroxyl-Gruppe an Position 7 sind für Wirbeltiere prätoxisch (Senecionin-Typ in Abb. 1.1). Diese werden durch mikrosomale Cytochrom P450 Monooxygenasen im Leber- und Lungengewebe bioaktiviert, indem sie in instabile alkylierende Pyrrolderivate überführt werden. Diese haben geno- und zytotoxische Effekte zur Folge (MATTOCKS, 1986; CHEEKE, 1988; STEGELMEIER *et al.*, 1999), wenn sie mit Proteinen und Nukleinsäuren reagieren. Aber auch die polaren *N*-Oxide werden als potentiell toxisch angesehen, da sie im Darm nicht angepasster Insekten und Vertebraten in die entsprechenden tertiären Formen umgewandelt werden. Einzelne Vertebraten jedoch, wie z.B. das Meerschweinchen oder der Hamster besitzen eine mikrosomale Multisubstrat-Flavin-Monooxygenase, die das tertiäre prätoxische Alkaloid zuverlässig in ihr polares *N*-Oxid überführt, welches danach ausgeschieden wird (MIRANDA *et al.*, 1991).

Bestimmte Insekten wurden im Laufe der Koevolution in die Lage versetzt, die Toxizität der PAs zu überwinden (HARTMANN *et al.*, 1997; LINDIGKEIT *et al.*, 1997; HARTMANN *et al.*, 1999; HARTMANN *et al.*, 2001) oder sogar zu ihrem eigenen Vorteil zu nutzen (BOPPRÉ, 1995; BROWN und TRIGO, 1995; EISNER und MEINWALD, 1995; HARTMANN, 1999; HARTMANN und OBER, 2000). So wurde in den Larven von *Tyria jacobaeae* (Arctiidae) eine Flavin-Monooxygenase (Senecionin *N*-Oxygenase, SNO) gefunden. Diese überführt die passiv in die Hämolymphe absorbierten prätoxischen tertiären PAs durch *N*-Oxidation in ihre nicht toxischen *N*-Oxide (LINDIGKEIT *et al.*, 1997). Sequenzanalysen der SNO aus *T. jacobaeae* erga-

ben, dass sie eine charakteristische Signalsequenz extrazellulärer Proteine aufweist und zur großen Familie Flavin-abhängigen Monooxygenasen gehört (NAUMANN *et al.*, 2002).

## 1.2 Die Bedeutung der Homospermidinsynthase (HSS) in der Biosynthese von PAs

Als erstes spezifisches Enzym der PA-Biosynthese konnte die pflanzliche HSS (EC 2.5.1.45) durch die Kombination von *in vivo* Hemmexperimenten und enzymatischen Studien identifiziert werden. BÖTTCHER *et al.* (1993) konnten zeigen, dass in einer NAD<sup>+</sup>-abhängigen Reaktion der Aminobutylrest des Spermidins unter Abspaltung von 1,3-Diaminopropan auf Putrescin übertragen wird, wodurch Homospermidin als erstes stoffwechselspezifisches Zwischenprodukt der PA-Biosynthese entsteht (KHAN und ROBBINS, 1985). SPENSER (1985) und ROBBINS (1989) konnten zuvor in radioaktiven Tracerexperimenten zeigen, dass sich das Kohlenstoffskelett der Necinbase aus Ornithin und/oder Arginin über Putrescin und Homospermidin ableitet. Putrescin ist das Substrat der Spermidinbiosynthese (GRASER und HARTMANN, 2000). In *Senecio*-Arten wird Putrescin ausschließlich über den Arginin/Agmatin-Weg gebildet und nicht über die direkte Decarboxylierung von Ornithin (HARTMANN *et al.*, 1988).

Homospermidin unterliegt im Gegensatz zu den Polyaminen Spermidin und Putrescin keinem Abbau, sondern wird komplett in die Necinbase eingebaut (RANA und ROBBINS, 1983; SANDER und HARTMANN, 1989; BÖTTCHER *et al.*, 1993). Somit kommt der HSS eine Schlüsselrolle in der Steuerung des Substratflusses vom Primär- zum Sekundärstoffwechsel zu.

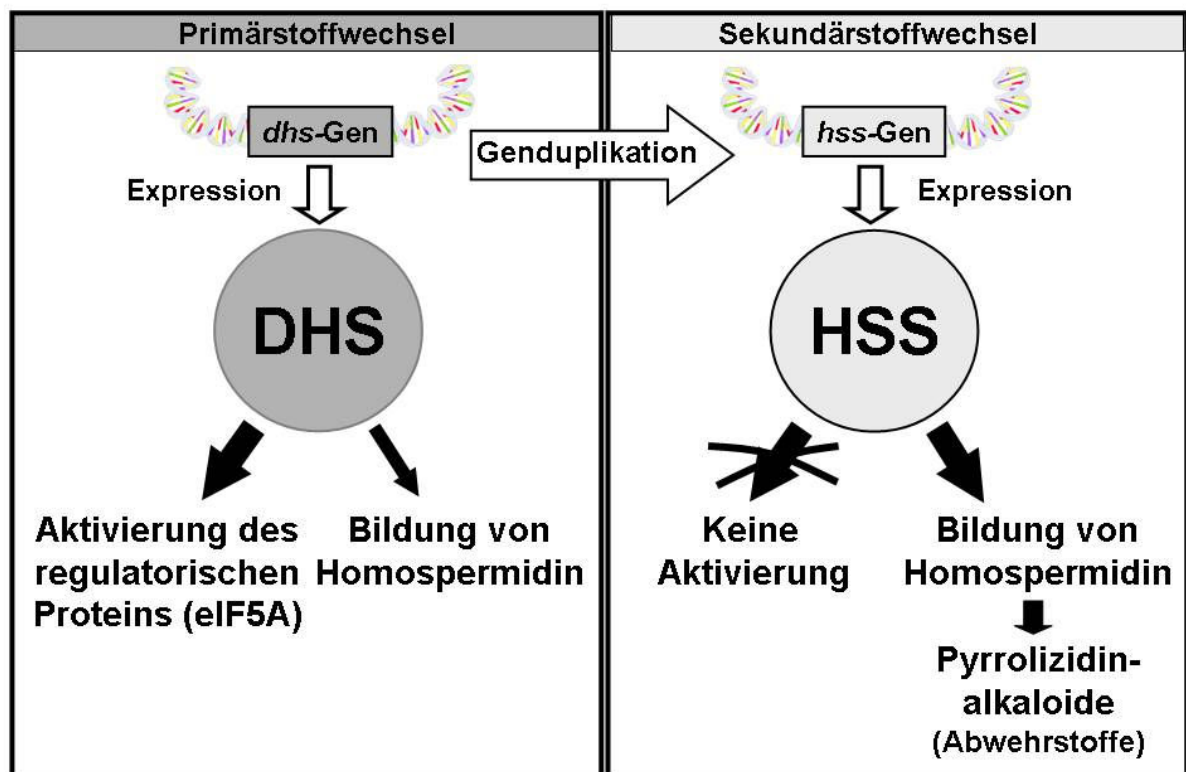
## 1.3 Evolutiver Ursprung der HSS aus der Desoxyhypusinsynthase (DHS)

Aufgrund der zentralen Stellung der HSS in der PA-Biosynthese ist es wichtig, die Frage nach dem evolutiven Ursprung dieses Enzyms zu beantworten. Weil PAs nur in den Angiospermen vorkommen, wird angenommen, dass die Entstehung dieses Stoffwechselweges ein relativ junges Ereignis in der Evolution darstellt. OBER und HARTMANN (1999b) ist es gelungen, die HSS aus *Senecio vernalis* zu isolieren und zu charakterisieren. Vergleichende Sequenzanalysen haben eine auffällige Ähnlichkeit der HSS zu einem Enzym des Primärstoffwechsels, der Desoxyhypusinsynthase (DHS, EC 2.5.1.46) ergeben. Diese Sequenzhomologie lässt vermuten, dass die HSS aus der DHS hervorgegangen ist (OBER und HARTMANN 1999b, 2000). Un-



MANN, 1999b). Daraus lässt sich ableiten, dass die alkaloidspezifische HSS eine DHS war, die ihre Hauptaktivität, die Aminobutylierung des eIF5A, verloren hat. Zur neuen Hauptaktivität dieser DHS wurde ihre ursprüngliche Nebenreaktion, die Aminobutylierung von Putrescin (Abb. 1.3).

Sowohl HSS als auch DHS bilden homotetramere Holoproteine, deren Untereinheiten eine Größe von etwa 45 kDa aufweisen. Beide Enzyme haben ein pH-Optimum von 9,5 (OBER *et al.*, 2003b). Diese Anhäufung von Ähnlichkeiten legt den Schluss nahe, dass die HSS aus der ubiquitär vorkommenden DHS durch Genduplikation und anschließendem Funktionswechsel (OBER und HARTMANN, 1999b) entstanden ist (Abb. 1.3).



**Abb. 1.3:** Evolutionäre Entstehung der HSS durch Duplikation des DHS-codierenden Gens und anschließendem Verlust der DHS-Aktivität [modifiziert nach OBER und HARTMANN, 2000].

## 1.4 Die Pflanzenfamilie der Boraginaceae

Bisherige Untersuchungen an PA-produzierenden Vertretern der Asteraceae zeigten, dass die Alkaloide ausschließlich in den Wurzeln gebildet werden (HARTMANN *et al.*, 1989). Mit Hilfe der Immunolokalisation konnten MOLL *et al.* (2002) an *S. vernalis* (Asteraceae, Tribus Senecioneae) und ANKE *et al.* (2004) an *E. cannabinum* (Asteraceae, Tribus Eupatorieae) zeigen, dass die HSS in diesen Arten ausschließlich in den Wurzeln exprimiert wird.

Betrachtet man die Pflanzenfamilie der Boraginaceae so ergibt sich ein differenziertes Bild hinsichtlich der Lokalisation des PA-Biosyntheseortes. So konnte bisher in *Symphytum officinale* die PA-Biosynthese nur in Wurzelorgankulturen nachgewiesen werden (FRÖLICH, 1996). In *Heliotropium spathulatum* und *Heliotropium indicum* wies das gesamte Sproßsystem die Fähigkeit zur PA-Bildung auf, wobei in jungen Blättern die höchsten Aktivitäten nachgewiesen wurden (BIRECKA und CATALFAMO, 1982; FRÖLICH, 1996). Dagegen konnten in einjährigen Rosettenpflanzen von *Cynoglossum officinale* sowohl die isolierten Wurzeln als auch das isolierte Sproßsystem PAs synthetisieren (VAN DAM *et al.*, 1995).

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Das sporadische Vorkommen von PAs in nicht nahe miteinander verwandten Pflanzenfamilien innerhalb der Angiospermen hat die Frage nach dem evolutionären Ursprung der HSS aufgeworfen. Ist die HSS nur einmal sehr früh in der Angiospermenevolution entstanden und anschließend in diversen Abstammungslinien verloren gegangen oder ist sie polyphyletischen Ursprungs? In diesem Fall hätte die HSS mehrfach unabhängig aus der DHS entstehen müssen und zusätzlich der komplette PA-Biosyntheseweg rekrutiert werden müssen, um PAs nahezu identischer Struktur synthetisieren zu können. Um diese Frage zu klären, wurden cDNA-Sequenzen, die für die entsprechenden DHS- und HSS-Proteine codieren, aus verschiedenen Vertretern der Boraginaceae (*Cynoglossum officinale*, *Heliotropium indicum* und *Symphytum officinale*) identifiziert, kloniert, sequenziert, biochemisch charakterisiert und zur phylogenetischen Analyse zur Verfügung gestellt. Um die phylogenetischen Analysen zu ergänzen, wurde mit *Petasites hybridus* ein Vertreter der Asteraceae (Tribus Senecioneae) ausgewählt, der mit den bereits untersuchten Senecioneae (*S. vernalis*, *S. vulgaris* und *S. jacobaea*) nicht so nahe verwandt ist.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Für die Versuche zur vorliegenden Arbeit wurden, sofern nicht anders erwähnt, Chemikalien der folgenden Firmen in „p.a.“ bzw. „reinst“-Qualität verwendet:

Aldrich	Gerbu	Qiagen
Amersham-Pharmacia	Invitrogen	Roche
Applchem	Macherey- Nagel	Roth
Biomol	MBI-Fermentas	Serva
Bio-Rad	Merck	Sigma
Duchefa	New England Biolabs	Stratagene
Fluka	Promega	Westfalen

Alle wässrigen Lösungen wurden mit MilliQ (Millipore) Wasser angesetzt.

### 2.2 Pflanzenmaterial und Pflanzenanzucht

#### 2.2.1 *Cynoglossum officinale* (Boraginaceae)

Herkunft: Die Pflanzen stammen aus dem Arzneipflanzengarten des Institutes für Pharmazeutische Biologie der Technischen Universität Braunschweig, wo sie jährlich von den Gärtnern kultiviert wurden.

Zur Nukleinsäureisolierung wurden junge und alte Wurzeln, junge und alte Sprosse, junge und alte Blätter, Knospen, Blüten und Früchte separat gesammelt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Pflanzenmaterial bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Für die Untersuchung der Keimlinge wurden aus dem Arzneipflanzengarten gesammelte Samen im März in Anzuchterde ausgesät und im Gewächshaus bei  $20^{\circ}\text{C}$  und Tageslicht kultiviert. Die verschieden alten Keimlinge wurden in die zu untersuchenden Organe zerteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zu ihrer Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.2.2 *Heliotropium indicum* (Boraginaceae)**

Herkunft: Gewächshaus des Institutes für Pharmazeutische Biologie der TU Braunschweig.

Für die Gewinnung der Nukleinsäuren wurden junge und alte Wurzeln, junge und alte Stängel, junge und alte Blätter, Knospen, Blüten und Früchte separat gesammelt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Lagerung der Proben fand bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung statt.

### **2.2.3 *Symphytum officinale* (Boraginaceae)**

Herkunft: Die Sterilkultur dieser Pflanze war bereits vor Beginn der Arbeit am Institut etabliert worden und wurde von Frau Loretta Heise kultiviert. Als weiteres Pflanzenmaterial wurden die Pflanzen aus dem Arzneipflanzengarten des Institutes für Pharmazeutische Biologie der TU Braunschweig verwendet.

Für die Gewinnung von Nukleinsäuren wurden junge Wurzeln und junge Blätter der Pflanze in Sterilkultur verwendet. Von der Gartenpflanze wurden für Transkriptionsanalysen junge und alte Wurzeln, junge und alte Stängel, junge und ältere Blätter, Knospen und Blüten verwendet.

Für Tracerexperimente wurden junge und mittelalte Blätter der Gartenpflanze zum Zeitpunkt des Blühens verwendet.

### **MS 20–Medium**

Es handelt sich hierbei um ein Sterilkulturmedium für *S. officinale*, dass nach Murashige und Skoog (1962) verändert wurde.

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,33 g
KNO <sub>3</sub>	1,90 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,37 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,17 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,44 g
Saccharose	30,00 g
Na-Fe-EDTA	0,04 g
Myo-Inositol	0,10 g
PM <sub>6</sub> -Stammlösung	1 ml
Spurenelemente-Stammlösung	1 ml
KI-Stammlösung	1 ml
<hr/>	
Wasser	ad 1000 ml, pH 5,8

Das Medium wurde in 500 ml Erlenmeyerkolben zu je 100 ml abgefüllt, 0,9 g Agar zugesetzt und anschließend bei 121°C, 1,2 bar für 20 min sterilisiert.

<b>Spurenelemente-Stammlsg.</b>		<b>PM<sub>6</sub>-Stammlsg.</b>	<b>Kaliumiodid-Stammlsg.</b>
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	10,0 g	Mesoinositol 100 g	KI 750 mg
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	8,6 g	Thiamin-HCl 10 g	Wasser ad 1000 ml
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2 g	Nicotinsäure 1 g	
NaMoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,250 g	Pyridoxin-HCl 1 g	
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,025 g	Wasser ad 1000 ml	
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,025 g		
Wasser	ad 1000 ml		

#### **2.2.4 *Petasites hybridus* (Asteraceae/Senecioneae)**

Herkunft: Die Pflanze war bereits als Sterilkultur am Institut für Pharmazeutische Biologie etabliert und wurde von Frau Loretta Heise kultiviert.

Zur Gewinnung der Nukleinsäuren wurden Wurzeln, Blattstiele und Blätter verwendet.

#### **MSOH-Medium**

Dabei handelt es sich um ein Sterilkulturmedium ohne Hormone, dass ebenfalls nach MURASHIGE und SKOOG (1962) modifiziert wurde.

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,650 g
KNO <sub>3</sub>	1,900 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,440 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,370 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,170 g
Saccharose	30,00 g
Na-Fe-EDTA	0,040 g
Myo-Inositol	0,100 g
PM <sub>6</sub> -Stammlösung	1 ml
Spurenelemente-Stammlösung	1 ml
KI-Stammlösung	1 ml
<hr/>	
Wasser	ad 1000 ml, pH 5,8

Das Medium wurde in 500 ml Erlenmeyerkolben zu je 100 ml aliquotiert, 0,9 g Agar zugesetzt und anschließend bei 121°C, 1,2 bar für 20 min sterilisiert.

### 2.2.5 *Eupatorium cannabinum* (Asteraceae/Eupatorieae)

Herkunft: Diese Pflanze war als Sterilkultur am Institut für Pharmazeutische Biologie der TU Braunschweig etabliert und wurde von Frau Dorothee Langel kultiviert.

Zur Gewinnung der Nukleinsäuren wurden junge Blätter verwendet.

## 2.3 Wirtsstämme von *Escherichia coli*

### 2.3.1 Kulturbedingungen

Die Kultivierung von Bakteriensuspensionskulturen erfolgte bei 37°C unter ständigem Schütteln (250 rpm) in flüssigem LB-Medium. Diese Suspensionskulturen wurden zum einen verwendet, um einen hohen Bakterienерtrag und damit genügend Plasmid-DNA für notwendige Restriktionsanalysen und spätere Sequenzierungen bereit zu stellen. Zum anderen wurden sie nach Induktion zur Expression rekombinanten Proteins eingesetzt.

LB-Agarnährböden wurden zum Ausstreichen (kurzzeitige Konservierung) oder Ausspateln (Vereinzeln zur Selektion) von Bakterienkulturen verwendet. Die Platten wurden ebenfalls bei 37°C inkubiert.

**LB-Medium**

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
pH 7,5	

Zur Herstellung von festen LB-Agarnährböden wurden dem flüssigen LB-Medium nach dem Einstellen des pH-Wertes 16g/l Agar zugesetzt und anschließend bei 121°C für 20 min autoklaviert. Das auf etwa 60°C abgekühlte Medium konnte nun unter der sterilen Werkbank in die sterilen Plastikpetrischalen (ca. 12 ml pro Plastikpetrischale) gegossen werden. Nach Erstarren des Mediums konnten die Agarnährböden in Plastiktüten verpackt bei 4°C im Kühlschrank für mehrere Wochen gelagert werden. Für Flüssigkulturen wurden 50 ml LB-Medium in einen 300 ml Erlenmeyerkolben überführt, mit Aluminiumfolie verschlossen und unter den oben angegebenen Bedingungen autoklaviert. Die Lagerung der Flüssigkulturen erfolgte bei Raumtemperatur. Vor Gebrauch der sterilen flüssigen oder festen LB-Medien wurden steril-filtrierte Antibiotika zugesetzt. Die Konzentration dieser Antibiotika-Stammlösungen betrug für Ampicillin 50 mg/ml in H<sub>2</sub>O und für Kanamycin 10 mg/ml in H<sub>2</sub>O.

Für die Blau/Weiss-Selektion (2.5.13.1) wurde den festen LB-Nährböden X-Gal Stammlösung (40 mg/ml) zugesetzt und mit dem oberflächensterilisierten Drigalskispatel gleichmäßig verteilt. Die Endkonzentration im Medium betrug 80 µg/ml.

Die X-Gal-Stammlösung wurde in Dimethylformamid angesetzt und sterilfiltriert. Zum Schutz vor Licht wurde das Behältnis mit Aluminiumfolie umhüllt und bei -18°C gelagert.

**2.3.2 *E. coli* TOP 10 (Invitrogen)**

Dieser *E. coli*-Stamm wurde für die Klonierung mit dem TOPO-TA Cloning Kit verwendet. Diese Zellen enthalten den carboxyterminalen Teil des β-Galaktosidasegens (*lacZ*), das mit dem pCR2.1<sup>®</sup>-TOPO<sup>®</sup>-Vektor die Blau/Weiss Selektion der Klone ermöglicht, wenn ein Insert in den Vektor ligiert wird.

### 2.3.3 *E. coli* DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> (Invitrogen) und *E. coli* XL1 Blue (Stratagene)

Diese beiden Bakterienstämme wurden für die Transformation von Ligationsprodukten in pET-Vektoren verwendet. Ziel war die Gewinnung ausreichend großer DNA-Mengen zwecks Transformation in geeignete *E. coli*-Expressionsstämme.

### 2.3.4 *E. coli* BL21(DE3) (Invitrogen)

Der *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) wurde für die Proteinexpression eingesetzt. Es handelt sich bei diesem Bakterium um das Lysogen des Bakteriophagen DE3. Es besitzt ein DNA-Fragment, welches das *lacI*-Gen, den *lacUV5*-Promotor und das Gen für die T7-Polymerase enthält. Der *lacUV5*-Promotor wird durch Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid (IPTG) induziert, der die T7-RNA-Polymerase transkribiert, die wiederum für die Transkription der Ziel-DNA im pET3a-Vektor (3.4) verantwortlich ist.

## 2.4 Plasmide/Vektoren

### pCR2.1<sup>®</sup>-TOPO<sup>®</sup>-Vektor (Invitrogen)

Der 3,9 kb große, linearisierte pCR2.1<sup>®</sup>-TOPO<sup>®</sup>-Vektor ist Bestandteil des TOPO-TA Cloning<sup>®</sup> Kits (Invitrogen) und wurde für die Subklonierung von PCR-Produkten, die mit der *Taq*-DNA-Polymerase amplifiziert wurden, verwendet. Diese Polymerase besitzt eine terminale Transferase Aktivität, wodurch ein einzelnes Desoxyadenosine an die jeweiligen 3'-DNA-Enden der PCR-Produkte angefügt wird (CLARKE, 1988). Diese PCR-Produkte konnten anschließend direkt in den linearisierten Vektor ligiert werden, wobei dessen 3'-Desoxythymidinreste mit den vorhandenen A-Überhängen des PCR-Produktes hybridisieren und durch eine vektorgebundene Topoisomerase kovalent verbunden werden.

Die Insertionsstelle des pCR2.1<sup>®</sup>-TOPO<sup>®</sup>-Vektors liegt innerhalb der multiplen Klonierungsstelle, die wiederum innerhalb des *lacZ $\alpha$* -Genfragmentes für die Blau-Weiß-Selektion (2.5.13.1) liegt. Für die weitere Selektion besitzt der Vektor sowohl eine Ampicillin- als auch eine Kanamycin-Resistenz.

### **pCR<sup>®</sup>-XL-TOPO<sup>®</sup>-Vektor (Invitrogen)**

Dieser 3,5 kbp große Vektor wurde speziell für das Klonieren großer PCR-Produkte verwendet. Die Klonierungsstrategie basiert auf der des TOPO-TA Cloning<sup>®</sup> Kits.

Der Topo-XL-Vektor besitzt das *ccdB*-Gen, das am C-Terminus des *lacZa*-Fragmentes gebunden ist. Die Insertion eines großen PCR-Produktes verhindert die Expression des fusionierten *lacZa-ccdB*-Gens. Nur Bakterienzellen, die den Vektor mit dem darin ligierten PCR-Produkt beinhalten sind in der Lage nach der Transformation zu wachsen. Bakterienzellen, die den „leeren“ Vektor (ohne PCR-Produkt) in sich tragen sterben ab.

### **pET-3a-Vektor (Novagen)/pET-3a-mod-Vektor**

Der pET-3a-Vektor (STUDIER und MOFFAT, 1986; ROSENBERG *et al.*, 1987; STUDIER *et al.*, 1990) wurde Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* verwendet. Das Plasmid enthält das Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion. Die in den Vektor klonierte cDNA steht unter der Kontrolle des Promotors der RNA-Polymerase des Phagen T7. Dieser wird wiederum durch einen *lac*-Operator gesteuert. Nach Zugabe von IPTG als Induktor kann nun die Expression eines rekombinanten Proteins in einem geeigneten *E.coli*-Expressionsstamm erfolgen. Dazu muss dieser auf seinem Chromosom eine Kopie des T7-RNA-Polymerase-Gens besitzen, das vom Promotor P<sub>lac</sub> gesteuert wird. Des Weiteren besitzt der pET-3a-Vektor in seiner multiplen Klonierungsstelle die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *NdeI* und *BamHI*. Da sich die Erkennungssequenz des Enzyms *NdeI* in einigen Fällen auch innerhalb der zu klonierenden cDNAs befand, wurde zur Klonierung dieser cDNAs ein im Institut bereits früher modifizierter pET3a-Vektor (**Vektor pET-3a-mod**) verwendet (REIMANN *et al.*, 2004). Bei diesem modifizierten Vektor wurde die *NdeI*-Schnittstelle gegen eine *XhoI*-Schnittstelle ausgetauscht.

## **2.5 Molekularbiologische Methoden**

### **2.5.1 Extraktion von Nukleinsäuren**

#### **2.5.1.1 RNA-Extraktion mit RNeasy<sup>™</sup> Plant Mini Kit**

Zur Gewinnung der Gesamt-RNA mit dem RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) wurde frisch geerntetes oder bei –80°C gelagertes Pflanzenmaterial (ca. 100 mg) eingesetzt. Das unter Verwendung flüssigen Stickstoffs gemörserte Pflanzenmaterial wurde in einen Lysispuffer überführt, der das stark chaotrophe Salz Guanidinisothiocyanat enthält und somit enthaltende

RNasen inaktiviert. Um unlösliches Pflanzenmaterial zu entfernen und die Viskosität des Lysates zu reduzieren wurde eine Zentrifugation über die QIAshredder<sup>TM</sup>-Säule durchgeführt. Anschließend wurde Ethanol zum Lysat pipettiert, um die Bindungsstärke der RNA an die Silikagelmembran der RNeasy Minispin-Säule zu erhöhen. Bei der darauf folgenden Zentrifugation wurden Verunreinigungen, die auch degradierte RNAs enthalten, entfernt und in einem weiteren Zentrifugationsschritt die hochreine RNA ( $\geq 200$  Nukleotide) mit RNase-freiem Wasser eluiert. Die so erhaltenen RNA-Moleküle wurden bis zum weiteren Gebrauch bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.5.1.2 Extraktion genomischer DNA**

#### **2.5.1.2.1 Extraktion genomischer DNA mit DNeasy<sup>TM</sup> Plant Mini Kit**

Genomische DNA wurde aus etwa 100 mg frischem oder gefrorenem Pflanzenmaterial (junge Blätter aller untersuchter Pflanzen) mit dem DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) isoliert. Dazu wurden die Proben in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerkleinert und in einen Lysispuffer, der RNasen enthält überführt. Während der Lyse wurden Proteine und Polysaccharide durch im Puffer enthaltene Salze präzipitiert, sowie die RNA durch RNasen abgebaut. Die darauffolgende Zentrifugation in der QIAshredder<sup>TM</sup>-Säule diente der Entfernung dieser Präzipitate und weiterer Zellbestandteile. Zum nun klaren Lysat wurde Bindungspuffer und Ethanol (abs.) gegeben um der DNA die Bindung an die Silikagelmembran zu ermöglichen. Durch die im Puffer enthaltenden chaotrophen Salze wurden den in Lösung befindlichen hydratisierten Molekülen Wasser entzogen, was die Bindung der DNA an das Säulenmaterial ermöglichte. Verunreinigungen durch Proteine und Polysaccharide wurden in zwei folgenden Waschschritten entfernt, bevor die reine DNA mit 20  $\mu\text{l}$  10 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,0 eluiert wurde.

#### **2.5.1.2.2 Extraktion genomischer DNA mit Plant DNazol<sup>®</sup> Reagenz**

Aus einigen Pflanzenproben ließ sich unter Verwendung des DNeasy<sup>TM</sup> Plant Mini Kits keine genomische DNA isolieren, was vermutlich an pflanzlichen Inhaltsstoffen wie Polysacchariden und phenolischen Komponenten lag. In diesen Fällen wurde mit dem Plant DNazol Reagenz (Invitrogen) gearbeitet. Dabei wurde wie hier kurz stichpunktartig beschrieben vorgegangen:



1. Ca. 100 mg Pflanzenmaterial unter flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill zu einem feinen Pulver zerkleinern
2. In 300 µl DNazol-Reagenz + 2µl RNaseA (20mg/ml) aufnehmen, gründlich mischen
3. 5 min bei 25°C inkubieren, zwischendurch mehrmals mischen
4. 300 µl Chloroform dazugeben, vortexen
5. 5 min bei 25°C inkubieren, zwischendurch mehrmals mischen
6. 10 min bei 12000 x g zentrifugieren
7. Wässrige Phase in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführen
8. 225 µl Ethanol (absolut) zugeben, vorsichtig mischen, 5 min. bei Raumtemperatur inkubieren
9. 4 min bei 5000 x g zentrifugieren, Überstand verwerfen
10. 300 µl Waschlösung (1 VT (200 µl) DNazol + 0,75 VT (150 µl) Ethanol absolut, kräftig mischen, 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
11. 4 min bei 5000 x g zentrifugieren, Überstand verwerfen
12. 300 µl 70 % Ethanol zugeben, gut mischen
13. 4 min bei 5000 x g zentrifugieren, Überstand verwerfen
14. Pellet an der Luft trocknen lassen (~ 10-15 min)
15. Getrocknetes Pellet in 70 µl 10 mM Tris-HCL pH 8,0 aufnehmen
16. Eventuell auftretende unlösliche Bestandteile können durch Zentrifugation (4 min bei 12.000 x g) entfernt werden
17. Ausbeute ~ 50-300 µg DNA/g Pflanzenmaterial

### 2.5.1.3 Extraktion von Plasmid-DNA

Die Gewinnung und Reinigung von Plasmid-DNA erfolgte entweder nach einer Labormethode oder mit fertigen Kits. Bei der Verwendung von Kits wurde laut Herstellerprotokoll vorgegangen. Die Kits waren folgende:

Concert™ Rapid Plasmid Miniprep System	Invitrogen
Concert™ High Purity Plasmid Midiprep System	Invitrogen
NucleoSpin® Plasmid	Macherey – Nagel

Die Kits wurden verwendet um Plasmid-DNA hoher Reinheit für die Sequenzierung zu gewinnen.

Die Plasmid-DNA-Extraktion nach der Labormethode wurde vor notwendigen Restriktionsanalysen und für Klonierungen in Bakterienzellen durchgeführt. Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

1. 1,5 ml Bakterienkultur in ein Eppendorfreaktionsgefäß pipettieren,  
3 min bei ca. 6000 rpm Zentrifugieren  
Überstand restlos abnehmen
2. Pellet in 200 µl Lösung I suspendieren, vortexen und kurz auf Eis stellen
3. Zugabe von 400 µl Lösung II, durch 5maliges Invertieren mischen (nicht vortexen) und genau 5 min auf Eis stellen
4. Nach Zugabe von 300 µl 7,5 M Ammoniumacetatlösung mischen, 10 min auf Eis stellen und dann 10 min bei 13.000 rpm zentrifugieren → Fällung genomischer DNA
5. Den klaren Überstand in ein neues Gefäß überführen, mit 0,6 – 1 VT Isopropanol versetzen, mischen, 10 min bei Raumtemperatur inkubieren, 10 min bei 15.000 rpm zentrifugieren → Fällung der Plasmid-DNA
6. Pellet mit 500 µl 70 %igem Ethanol waschen, 3 min bei 15000 rpm zentrifugieren
7. Pellet bei Raumtemperatur trocknen
8. Pellet auflösen in 50 µl 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,0 (enthält 0,5 µg/ml DNase-free RNase, Roche) und für 30 min bei 37°C inkubieren um die RNA zu entfernen
9. Isolierte Plasmid-DNA kann bei -18°C gelagert werden

Die gereinigte Plasmid-DNA kann zur Transformation, als Template für eine PCR oder zur Restriktionsanalyse verwendet werden.

### **Lösung I**

Glukose		0,99 g (50mM)
Tris		0,30 g (25mM)
EDTA		0,37 g (10mM)
H <sub>2</sub> O	ad	100 ml
pH 8,0 (eingestellt mit 1M HCl vor dem Autoklavieren)		

### **Lösung II**

Lösung II wurde immer frisch angesetzt, indem die 10fach konzentrierten Stammlösungen von NaOH und SDS 1:10 (Volumen) gemeinsam mit sterilem Wasser verdünnt wurden.

**10x Stammlösung II**

NaOH	8 g / 100 ml H <sub>2</sub> O (2 M)
SDS	10 g / 100 ml H <sub>2</sub> O (10 %)

**Lösung II**

NaOH	0,2 M
SDS	1% (w/v)

**10 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,0**

Tris	12,11 g
H <sub>2</sub> O	ad 100 ml
pH 8,0 (eingestellt mit 1 M HCl vor dem Autoklavieren)	

**2.5.1.4 Reinigung von DNA aus Agarose-Gelen**

Nach erfolgter Agarose-Gelelektrophorese (2.5.10) wurden extrahierte DNA-Fragmente, die zur Restriktion oder Ligation gebraucht wurden, mittels QIAEX II oder QIAQuick (beide Qiagen) gereinigt. Die DNA wurde in Anwesenheit einer hohen Konzentration eines chaotrophen Salzes an Silicagelkügelchen (QIAEX II) oder Silicamembranen (QIAQuick) gebunden. Verunreinigungen wurden ausgewaschen, gereinigte DNA mit 10 mM Tris-HCl pH 8,0 eluiert.

**2.5.1.5 Reinigung von PCR- und Restriktionsprodukten**

Um optimale Bedingungen für weitere enzymatische Reaktionen, wie Restriktionsverdau oder Ligation von DNA zu schaffen, wurden PCR- und Restriktionsprodukte mittels Concert<sup>TM</sup> Rapid PCR Purification System (Gibco) oder Nucleospin Extract (Gibco) gereinigt. Nach Zugabe der Bindungslösungen zur DNA-Probe wurde der Ansatz auf eine silicagelhaltige Säule pipettiert. Doppelsträngige DNA zwischen 80 bp und 20 kbp wurde selektiv gebunden und konnte anschließend mit 10 mM Tris-HCl pH 8,0 eluiert werden.

## 2.5.2 Präzipitation von Nukleinsäuren

### 2.5.2.1 Präzipitation von DNA

Die Präzipitation von verdünnter wässriger DNA wurde bei Raumtemperatur in Eppendorfreaktionsgefäßen durchgeführt:

Verdünnte DNA	2 Teile
7,5 M Ammoniumacetatlösung	1 Teil
Ethanol absolut (Roth)	6 Teile

Der jeweilige Ansatz wurde durch mehrmaliges Invertieren gemischt, die Plasmid-DNA dann für 30 Minuten bei Raumtemperatur gefällt und anschließend für 30 Minuten bei 15.000 rpm zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und für weitere 15 Minuten abermals bei 15.000 rpm zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Ethanols wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet.

## 2.5.3 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Konzentrationen und Reinheiten von Nukleinsäuren wurden photometrisch (Ultraspec 3100 pro, Amersham Pharmacia Biotech) durch Absorptionsmessungen bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm bestimmt. Die Messungen erfolgten in Quarzglasküvetten, die eine Schichtdicke von 1 cm hatten (Hellma). Bei 260 nm entspricht eine Absorption von 1 einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml bzw. einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Proteinkontaminationen wurden bei 280 nm gemessen, so dass man über den Quotienten der Absorptionen bei 260 und 280 nm die Reinheit der Nukleinsäuren bestimmen kann. Dieser Wert sollte zwischen 1,5 und 2,0 liegen. Zur Gehaltsbestimmung wurde stets eine 1:100 Verdünnung der entsprechenden Nukleinsäure eingesetzt, die Konzentrationen dementsprechend nach folgenden Formeln berechnet:

Massenkonzentration der RNA (µg/ml) =  $A_{260\text{nm}}$  x 40 x 100 (Verdünnungsfaktor)

Massenkonzentration der DNA (µg/ml) =  $A_{260\text{nm}}$  x 50 x 100 (Verdünnungsfaktor)

### 2.5.4 Herstellung von cDNA

Als RNA-abhängige DNA-Polymerasen sind reverse Transkriptasen mit Hilfe eines geeigneten Oligonukleotides (Primer) dazu in der Lage, einzelsträngige RNA als Matrize zur Synthese eines komplementären DNA-Stranges (cDNA) zu verwenden. Für das Umschreiben der mRNA in cDNA wurde folgender Oligo-dT-Primer (5' - GTC GAC TCG AGA ATT CTT TTT TTT TTT TTT TTT - 3'), der an den Poly-A-Schwanz der mRNA bindet und Superscript II als reverse Transkriptase verwendet. Superscript II besitzt keine RNase H-Aktivität. Dies verlängert die Lebensdauer der RNA-Matrize und erhöht somit die Ausbeute an cDNA mit dem kompletten offenen Leserahmen des Gens. Diese so hergestellten cDNAs können anschließend als Vorlagen (template) für verschiedene PCR-Reaktionen (2.5.6) eingesetzt werden.

#### DMPC-Wasser

1 g DMPC wird in 50 ml Ethanol (absolut) und 50 ml H<sub>2</sub>O gelöst und anschließend mit H<sub>2</sub>O auf 1000 ml aufgefüllt. Nach 12 Stunden Inkubation bei 37°C wird der Ansatz bei 121°C , 1,2 bar für 20 min autoklaviert.

#### Ansatz

Gesamt-RNA (1 µg)	x µl
Oligo-dT-Primer (1 pmol/µl)	2,5 µl
DMPC- H <sub>2</sub> O	ad 15 µl

Ansatz 10 min bei 70°C inkubieren (Auftrennung von Sekundärstrukturen)

Kurz auf Eis stellen, dann:

5 x First Strand- Puffer	5 µl
DTT (0,1 M)	2,5 µl
dNTP's (je 10 mM)	1,25 µl

Ansatz 2 Minuten bei 42°C inkubieren, dann

<u>RT-Superscript II (200 U/µl; Invitrogen)</u>	<u>1,25 µl</u>
Endvolumen	25 µl

60 Minuten bei 42°C inkubieren.

15 Minuten bei 70°C inaktivieren.

Die cDNA kann anschließend bei -18°C gelagert werden.

### 2.5.5 Primer

Alle verwendeten Primer wurden in HPSF Qualität bei der Firma MWG-Biotech AG synthetisiert. Die Primer wurden mit 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,0 (hergestellt mit DMPC-Wasser, 2.5.4) auf eine Konzentration von 100  $\mu$ M aufgelöst und so bei  $-18^{\circ}\text{C}$  gelagert. Verwendet wurden die Primer in Arbeitskonzentrationen von 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M, die durch Verdünnung mit 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,0 hergestellt wurden.

#### 2.5.5.1 Entwurf degenerierter Primer

Das Design der degenerierten Primer basiert auf dem Vergleich von Aminosäuresequenzen homologer Proteine, die z.B. aus den Gendatenbanken erhalten werden können. Bei degenerierten Primern handelt es sich um ein Gemisch von Oligonukleotiden, die grundsätzlich eine sehr ähnliche Sequenz, an einigen (degenerierten) Stellen jedoch unterschiedliche Basen haben. Die Primer können in einer PCR eingesetzt werden um eine Vielzahl ähnlicher Sequenzen zu finden, aber auch um neue Genfamilien zu entdecken. Es sollten wenigstens zwei Bereiche/Blöcke konservierter Aminosäuren vorhanden sein, die somit den Bau degenerierter Forward- und Reverse-PCR-Primer ermöglichen. Die Primer sollten in etwa 20-30 Basenpaare lang sein.

Ein weiterer Aspekt, der beim Bau degenerierter Primer beachtet werden muss, ist der Grad der Primerdegeneriertheit. Die Primerdegeneriertheit ist hier das Produkt des degenerierten genetischen Codes der Aminosäuresequenzen von dem die Primersequenz abgeleitet wurde. Somit bestimmt die zum Primerbau verwendete Aminosäuresequenz die Degeneriertheit des Primers. Ist die Degeneriertheit eines Primers hoch, so nimmt die Zahl der verschiedenen Primer innerhalb des Primergemisches zu und die Konzentration des Primers ab, der exakt an die gesuchte cDNA passt. Es gibt mehrere Möglichkeiten die Degeneriertheit von Primern zu senken. Eine wäre die Verwendung der Base Inosin, eine weitere der Bau von zwei oder mehr verschiedenen Primerpopulationen, anstelle von nur einer mit hoher Degeneriertheit. Bei Inosin handelt es sich um eine Purinbase, die Basenpaare mit Cytosin, Guanin und Thymidin bildet. Inosin wird an den Positionen der Primer eingesetzt, wo mehrere der Basen benötigt werden. Weiterhin sollte sichergestellt sein das die verwendete DNA-Polymerase dazu in der Lage ist, DNA aus inosinhaltigen Templates zu synthetisieren. Die *Taq*-DNA-Polymerase besitzt diese Fähigkeit, andere *Taq*-Polymerasen (z. B. Vent) vermögen dies aber nicht.

### 2.5.5.2 Entwurf genspezifischer Primer

Generell sollten Primer aus mindestens 15 (vorzugsweise 18-21) Nukleotiden bestehen, von denen einer (forward oder reverse Primer) komplementär zu der zu suchenden HSS-/DHS-Sequenz sein muss und ungefähr 50 % G/C-Gehalt aufweisen. Wird eine Restriktionsschnittstelle am 5'-Ende des Primers eingebaut, so sollte diese noch durch 3 -10 (abhängig vom Restriktionsenzym) zusätzliche Nukleotide ergänzt werden, um die Restriktionseffizienz am Ende der cDNA zu erhöhen.

## 2.5.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

### 2.5.6.1 Standard-PCR

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ist eine *in vitro*-Methode zur selektiven Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Abschnittes unter Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase. Voraussetzung dafür sind zwei Oligonukleotidprimer, die den zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt flankieren. Die Primer binden so an die jeweiligen komplementären DNA-Stränge, dass nur der Bereich zwischen den Primern amplifiziert wird. Dieses DNA-Stück wird in jedem Zyklus der PCR verdoppelt, was zu einer exponentiellen Vervielfältigung der DNA führt ( $x = 2^n$ , wobei n die Anzahl der durchgeführten Zyklen angibt).

Jeder Zyklus einer PCR beinhaltet folgende Schritte, von denen die Dauer jeweils der Art und der Größe der zu vervielfältigenden DNA abhängt:

1. Denaturierung (denaturation) des DNA-Doppelstranges bei 95°C für 45 s
2. Anlagerung (annealing) der Primer an den jeweils komplementären DNA-Strang bei der Schmelztemperatur der jeweiligen Primer für 1 min
3. Elongation (elongation) der angelagerten Primer mit einer DNA-Polymerase bei 72°C für 2 min bis hin zu 10 min

Grundsätzlich wurden für die Amplifikationen 25 – 35 Zyklen eingesetzt. Die Zyklen starteten mit einem initialen Denaturierungsschritt bei 95°C für 3 – 5 min um die komplette Denaturierung der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge zu gewährleisten. Nach Abschluß der PCR-Zyklen erfolgte eine Elongation bei 72°C für 10 min um die PCR-Produkte zu kompletieren. Abschließend wurden die PCRs auf 15°C abgekühlt. In einigen Fällen waren die

Schmelztemperaturen ( $T_m$ ) der in einer PCR verwendeten Primer sehr unterschiedlich, so dass ein so genanntes „Touch Down“-Temperaturprogramm zum Einsatz kam, um die optimale Temperatur zu erfassen. Die Annealingtemperatur änderte sich dabei in jedem Zyklus um 0,5 bis 1°C, beginnend mit der höchsten Schmelztemperatur. Die jeweilige Zyklenzahl richtete sich nach dem Umfang des Temperaturbereiches. Nach Erreichen der unteren Schmelztemperatur wurde diese für weitere 10 Zyklen konstant gehalten. Zwei typische Standardtemperaturprogramme sind hier dargestellt:

<u>Standard</u>		<u>“Touch Down”</u>	
95°C	5 min	95°C	5 min
95°C	45 sec	95°C	45 sec
60°C <sup>*)</sup>	1 min	60 – 45°C <sup>**)</sup>	1 min
72°C	2 min	72°C	2 min
} 33 – 35 x		} 30 x	
72°C	10 min	95°C	45 sec
15°C	∞	45°C	1 min
		72°C	2 min
		} 10 x	
<sup>*)</sup> Annealingtemperatur konstant, abhängig von der Schmelztemperatur der Primer		72°C	10 min
		15°C	∞
		<sup>**) Annealingtemperatur wurde bei jedem Zyklus um 0,5°C herabgesetzt</sup>	

Nachfolgend aufgeführt sind die Standardkonditionen für PCRs die mit *Taq*-DNA-Polymerase (**A**) und mit der *Pfx*-DNA-Polymerase (**B**) als proof-reading DNA-Polymerase, durchgeführt wurden:

<u>Primer-Mix</u>	<b>A</b>	<b>B</b>
10 µM Forward Primer	1,0 µl	2,0 µl
10 µM Reverse Primer	1,0 µl	2,0 µl
Template: cDNA aus 2 µg RNA	1,0 µl	2,0 µl
H <sub>2</sub> O ad	15,0 µl	40,0 µl



**Puffer-Mix**

10 x PCR Puffer <sup>*)</sup>	2,5 µl	5,0 µl
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0,75 µl	
50 mM MgSO <sub>4</sub>		1,0 µl
10 mM dNTP-Mix	0,5 µl	1,5 µl
5 U/µl <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	0,125 µl	
3 U/µl <i>Pfx</i> -DNA-Polymerase		0,5 µl
H <sub>2</sub> O	ad	10,0 µl
Gesamtvolumen	25,0 µl	50,0 µl

<sup>\*)</sup> Die für die jeweiligen DNA-Polymerasen benötigten PCR-Puffer wurden vom Hersteller mitgeliefert

Bei mehreren PCR Reaktionen wurde der Puffer-Mix als „Master-Mix“ in ein auf Eis stehendes 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert. Bei dem so genannten „Hot-Start“ wurden zuerst die 15 µl Primer-Mix in ein 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß pipettiert, das Gefäß verschlossen und anschließend in den Thermocycler gestellt. Um die Spezifität der PCR-Reaktion zu erhöhen wurden sämtliche mit *Taq*-DNA-Polymerase durchgeführten PCRs als sogenannte „Hot-Start“ PCRs durchgeführt, bei denen die Zugabe der Polymerase erst nach Erreichen einer Temperatur von 94°C erfolgte. Nach der 3 – 5 minütigen initialen Denaturierung bei 95°C wurde der Puffer-Mix dazupipettiert.

Folgende Bezeichnungen für durchgeführte PCRs und ihre Bedeutung sind hier aufgelistet:

**RT-PCR:** (Reverse Transcription – PCR) PCR mit durch reverse Transkription von RNA erzeugter cDNA als Template.

**DOP-PCR:** (Degenerate Oligonucleotide Primed – PCR) PCR mit degenerierten Primern

**RACE-PCR:** (Rapid Amplification of cDNA Ends – PCR) RT-PCR mit genspezifischen Primern (GSPs) um die 5'- und 3'- Enden der cDNA zu identifizieren (2.5.6.2)

**Full-length-PCR:** PCR mit genspezifischen Primern (GSPs) um den gesamten Protein codierenden Bereich der cDNA zu amplifizieren

**Screening-PCR:** PCR mit transformierten *E. coli*-Kolonien als Template, um deren erfolgreiche Transformation durch Nachweis der transformierten DNA zu überprüfen. Als Primer wurden z.B. die GSPs der full-length-PCR eingesetzt.

### **2.5.6.2 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)-PCR**

Bei der so genannten RACE-PCR nutzt man einen bekannten internen Sequenzbereich einer DNA-Sequenz, um die noch fehlenden 3'- und 5'-Enden zu amplifizieren. Dieser bekannte interne Sequenzbereich wurde z.B. zuvor über DOP-PCR erhalten.

#### **3'-RACE**

Für die 3'-RACE wurde eine Reverse Transkription zur Synthese des ersten cDNA-Stranges wie unter Punkt (2.5.4) beschrieben durchgeführt. Diese cDNA wurde in der darauf folgenden PCR als Template eingesetzt. Mit Hilfe eines genspezifischen forward-Primers, der sich an eine bekannte Sequenzregion anlagert und einem reverse Oligo-dT-Primer (2.5.4), der sich an den poly(A)-Schwanz der cDNA anlagert, wurde das unbekannte 3'-Ende einschließlich des 3'-nichtcodierenden Bereichs amplifiziert.

#### **5'-RACE**

Im Gegensatz zur 3'-RACE ist die 5'-RACE etwas aufwendiger in ihrer Durchführung. Hier muss nach der erfolgreichen Synthese des ersten cDNA-Stranges eine künstliche Verlängerung an das 3'-Ende der cDNA (komplementär zum 5'-Ende der mRNA) angefügt werden, um dieses Ende in ähnlicher Weise wie bei der 3'-RACE zu amplifizieren. Die Synthese des cDNA-Stranges erfolgte hier mit einem ersten genspezifischen reverse Primer (GSP1), um nur die mRNA in cDNA umzuschreiben, zu der das 5'-Ende ermittelt werden soll. Nach der Synthese des cDNA-Stranges wurde die gesamte RNA durch Zugabe eines RNase-Mix (ein 1:1 Mix von RNase H:RNase T2) verdaut. RNase H ist eine Endoribonuklease, die 5'-Phosphodiesterbindungen der an die DNA hybridisierten RNA spaltet. Die cDNA wurde nach dem Verdau mit einem PCR-Aufreinigungskit gereinigt, um überschüssiges Enzym, nicht eingebaute dNTPs und den verwendeten GSP zu entfernen. Anschließend wurde an die gereinigte genspezifische cDNA unter Verwendung von dCTPs und einer terminalen Transferase (rTdT, rekombinant; Invitrogen) ein künstlicher Oligo-dC-Schwanz angefügt. Die so verlängerte cDNA konnte in der darauffolgenden PCR mit einem zweiten genspezifischen reverse Primer (GSP2), der „innerhalb“ des GSP1 bindet und einem gegenläufigen poly-G-

enthaltenden Ankerprimer (AAP, Abridged Anchor Primer) amplifiziert werden. Falls diese PCR kein Amplifikat lieferte, konnte mit einem weiteren weiter innen liegenden reverse Primer (GSP3), und einem zweiten, auch weiter innen liegenden forward Ankerprimer (AUAP) amplifiziert werden (Tab. 2.1).

**Tabelle 2.1: Für die 5'- und 3'-RACE verwendete Standard-Primer**

Oligonukleotidsequenz		T <sub>m</sub> (°C)
<b><u>3'-RACE-Primer (reverse Primer)</u></b>		
Oligo-dT-Primer	5'-GTC GAC TCG AGA ATT CTT TTT TTT TTT TTT TTT -3'	59,5
<b><u>5'-RACE-Primer (forward Primer)</u></b>		
AAP	5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG -3'	77,4
AUAP	5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC -3'	65,7

A = Adenin  
G = Guanin  
I = Inosin

} Purinbasen

T = Thymin  
C = Cytosin

} Pyrimidinbasen

### 2.5.7 RT-PCR

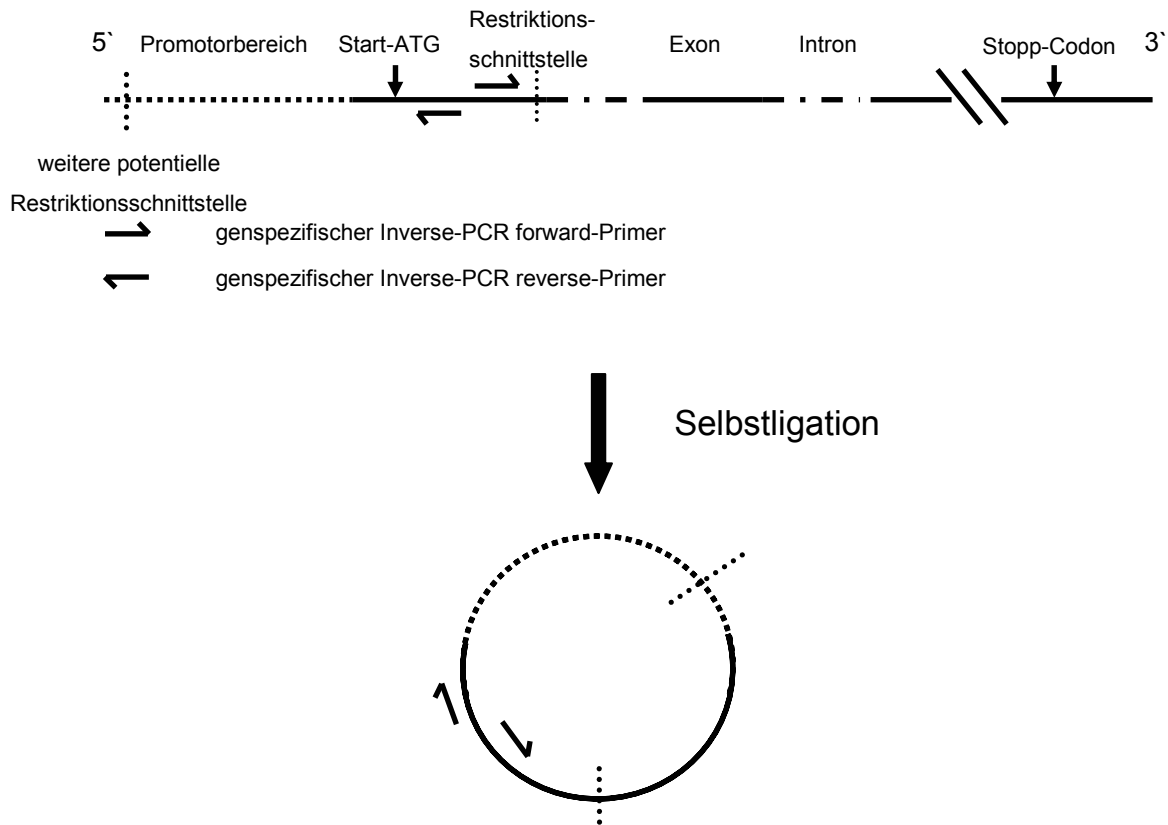
Um Hinweise auf Transkriptionsorte von Genen zu erhalten wurde mit den zu untersuchenden Pflanzen RT-PCRs durchgeführt (2.2). Dazu wurde aus den unterschiedlichen Geweben die Gesamt-RNA (2.5.1.1) isoliert und anschließend in einer PCR gescreent (2.5.6.1).

Als Primer dienten die jeweiligen Expressionsprimer (Amplifikation der cDNA des Gens vom Start-ATG bis zum Stopp-Codon), die für die jeweilige HSS und DHS der Pflanze codieren.

### 2.5.8 Inverse-PCR

Die Anwendung der inversen PCR diente in diesem Falle dazu potentielle Promotorregionen der gefundenen HSS- und DHS-Gene zu finden. Dazu wurde nach der Isolation genomischer DNA (2.5.1.2.2) diese zunächst mit einem Restriktionsenzym, das nahe am 5'-Ende schneidet, inkubiert und geschnitten. Der Restriktionsansatz mit den darin enthaltenen Fragmenten wurde verdünnt und unter Bedingungen, die die Zirkularisation (Selbstligation) dieser einzel-

nen DNA-Abschnitte fördert, ligiert. In der darauf folgenden PCR konnte mit zwei genspezifischen-Primern, die im 5'-codierenden Bereich in „inverse“ Orientierung (siehe Abb.:2.1) lagen, die bekannte Sequenz (Überlapp) mit der davor liegenden Promotorregion im ringförmigen DNA-Molekül amplifiziert werden.



**Abb. 2.1:** Schematische Darstellung der Inversen PCR an einem Beispiel, bei dem es um die Identifizierung einer potentiellen Promotorregion geht.

### Restriktion der genomischen DNA

1 µg genomische DNA		x µl
10x Restriktions-Puffer		2 - 5 µl
10 – 20 U/µl Restriktionsenzym		2 - 3 µl
Wasser	ad	20 µl

Inkubation für 1,5 h bei 37°C

Stoppen der Reaktion z.B. durch Hitzeinaktivierung für 20 min bei 65°C

Gelcheck (erfolgreiche Restriktion: die genomische DNA war im Gel nicht als diskrete Bande sondern als „Schmier“ erkennbar)

**Ligation der geschnittenen genomischen DNA**

Restriktionsansatz	15 µl
5x Ligations-Puffer	50 µl
T4-DNA-Ligase	6 µl
Wasser	ad 250 µl
→ Inkubation bei 16°C für mind. 16 h	
→ Fällern des Ligationsansatzes	

**Fällen des Ligationsansatzes**

Ligationsansatz	250 µl
7,5 M Ammoniumacetat-Lösung	125 µl
Ethanol absolut	750 µl
→ mischen	
→ 30 min bei Raumtemperatur inkubieren	
→ 30 min bei 15.000 rpm zentrifugieren	
→ mit 70 % Ethanol waschen	
→ getrocknetes Pellet in 20 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,0 aufnehmen	

**PCR-Ansatz****A) Vorlage (in PCR-Tube)**

Forward-Primer (10 µM)	1,0 µl
Reverse-Primer (10 µM)	1,0 µl
gefällter Ligationsansatz	4,0 µl
Wasser	4,0 µl

- 2 min 94°C  
→ dann Zugabe von 10 µl Mix

**Mix**

10x <i>Pfu</i> -Amplifikations-Puffer	2,00 µl
10mM dNTPs	0,75 µl
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (Promega)	0,25 µl
Wasser	7,00 µl

- PCR nach B) durchführen

**PCR-Programm**

<b>B)</b>	<u>94°C</u>	<u>2 min</u>	
	94°C	30 s	
	*°C	45 s	33x
	<u>68°C</u>	<u>4 min</u>	
	68°C	4 min	
	15°C	∞	
	*°C: primerabhängig		

Nach erfolgtem elektrophoretischem Auftrennen der DNA (2.5.10) wurden die erhaltenen Banden wie unter Kap. 2.5.11.1 beschrieben kloniert.

### 2.5.9 PCR genomischer DNA zur Analyse der Exon-Intron-Struktur

Zur Identifizierung der Exon-Intron-Struktur der Gene wurde genomische DNA (2.5.1.2) in einer PCR als Template eingesetzt. Als Primer wurden die jeweiligen Expressionsprimer zur Amplifikation der „full-length“-Sequenz verwendet (Tab.7.1 im Anhang). Die PCR-Ansätze und die Temperaturprogramme setzten sich wie folgt zusammen:

#### PCR-Ansatz

10x Accu- <i>Taq</i> -Puffer	2,50 µl
Expressions-forward-Primer	1,00 µl
Expressions-reverse-Primer	1,00 µl
genomische DNA (40 – 200 ng/µL)	1,00 µl
10 mM dNTPs	1,25 µl
Accu <i>Taq</i> LA <sup>TM</sup> -DNA Polymerase Mix (5 U/µl, Sigma)	0,25 µl
Wasser	ad 25,00 µl

#### PCR-Programm

98°C	30 s	} 30x
94°C	15 s	
65°C *)	20 s	
68°C	20 min	
68°C	10 min	
15°C	∞	

\*) : die verwendete konstante Annealingtemperatur lag bei 65°C oder 68°C

Nach der Auftrennung der PCR-Produkte über die Agarosegelelektrophorese konnten die Amplifikate wie unter Kap. 2.5.11.1 beschrieben kloniert werden. Eine zusätzliche Inkubation mit *Taq*-DNA-Polymerase war dazu nicht nötig, da der Accu *Taq* LA<sup>TM</sup>-DNA Polymerase Mix eigene A-Überhänge anfügte (siehe Kap. 2.5.11.1)

### 2.5.10 Elektrophoretische Trennung und Detektion von DNA und RNA

Über eine Agarose-Gelelektrophorese wurden die zu untersuchenden Nukleinsäuren ihrer Größe nach aufgetrennt. Aufgrund der erwarteten Fragmentgrößen wurden 1% ige bis 2,5 %ige Agarose-Gele verwendet. Dazu wurde die erforderliche Menge an Agarose (NEEO

Ultra-Qualität, Roth) abgewogen, in 1x TBE-Puffer suspendiert, geschmolzen, auf etwa 60°C abgekühlt und nach Zugabe von 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml Stammlösung) pro 20 ml Gel in einen unter dem Abzug stehenden Gelschlitten gegossen, um es dann bei Raumtemperatur erstarren zu lassen. Alle Arbeitsschritte mit Ethidiumbromid erfolgten unter dem Abzug.

Nach Zugabe von 0,5 VT DNA-Probenpuffer zur jeweiligen Nukleinsäure-Probe wurde diese durchmischt und in die Geltaschen pipettiert. Der Probenpuffer diente zur Erhöhung der Probenkonzentration und als Kontrollmarker. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurden bei jeder Auftrennung von DNA eine 100 bp- und/oder 1 kb DNA-Leiter (Invitrogen) mit aufgetragen.

Die Trennung der Nukleinsäuren erfolgte in einer mit 1xTBE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer (Mini Sub Cell GT, BioRad) bei 2,8 V/cm Elektrodenabstand (Spannungsgeber Consort E 815, LFT). Die Nukleinsäuren wurden im Gel durch UV-Licht (Multiimage Lightcabinet, Biozym) detektiert (Ethidiumbromid interkaliert mit der Nukleinsäure und fluoresziert) und mit dem Alphaimager 1220 (Software-Version 5.5) dokumentiert.

#### **10xTBE-Puffer**

Tris-Base	108,0 g
Borsäure	55,0 g
EDTA	7,5 g
Wasser	ad 1000 ml

#### **DNA-Probenpuffer**

Xylencyanol	0,25 g
Bromphenolblau	0,25 g
Ficoll 400	25,00 g
EDTA	1,46 g
Wasser	ad 1000 ml

### **2.5.10.1 Restriktionsverdau**

Restriktionsendonukleasen der Klasse II erkennen in doppelsträngigen DNA-Abschnitten palindromische Sequenzen und hydrolisieren diese spezifisch zwischen zwei Basen, wodurch Enden mit definierten Basenabfolgen entstehen. In der hier vorliegenden Arbeit wurden diese Enzyme einerseits zur Vorbereitung von Klonierungsreaktionen (2.5.11), andererseits zum Nachweis des Zielgens nach erfolgten Klonierungen (Restriktionsanalyse) verwendet.

Standard-Restriktionsansätze hatten folgende Zusammensetzung:

	<u>Für Klonierungsreaktionen</u>	<u>Für Restriktionsanalysen</u>
DNA	1–2 µg	3 µl (aus Plasmidpräparation)
Restriktionsenzym(e)	10 U	1 U
10 x Reaktionspuffer	2-5 µl	0,4 µl
Wasser	ad 20-50 µl Gesamtvolumen	ad 4 µl Gesamtvolumen

Dabei entspricht definitionsgemäß 1 Unit (1 U) der Restriktionsenzyme derjenigen Menge, die 1 µg doppelsträngige DNA in 1 h schneidet. Die Inkubation der Reaktionen erfolgte im Temperaturoptimum der jeweiligen Enzyme für 1 h bei Restriktionsanalysen und für 2-16 h bei Klonierungsreaktionen. Sollten zwei Restriktionsenzyme in einem sogenannten Doppelverdau eingesetzt werden, ist darauf zu achten, dass diese im selben Puffer bei derselben Temperatur aktiv sind. Ist dies nicht möglich, kann mit beiden Enzymen nacheinander geschnitten werden, wobei mit dem Enzym, das bei einer geringeren Salzkonzentration optimal arbeitet, begonnen wird.

## 2.5.11 Klonierung von PCR-Produkten

### 2.5.11.1 Klonierung in TOPO Vektoren

Der fertige pCR2.1<sup>®</sup>-TOPO<sup>®</sup>-Vektor (2.4) erlaubt das direkte Klonieren von PCR-Produkten, die mit *Taq*-DNA-Polymerase amplifiziert wurden. PCR-Produkte, die länger als 24 h bei 4°C gelagert wurden oder solche, die mit *Pfu*- oder *Pfx*-DNA-Polymerasen amplifiziert wurden, mussten für 10 min bei 72°C mit Zugabe von *Taq*-DNA-Polymerase inkubiert werden, um einzelne dATP-Überhänge am jeweiligen 3'-Ende des PCR-Produktes zu erzeugen, die für die Klonierung notwendig sind.

Die Klonierung begann mit der elektrophoretischen Auftrennung eines Aliquots des PCR-Ansatzes in einem 1,5 % igen „low-melt“-Agarosegels. Eine einzelne, diskrete DNA-Bande wurde aus dem Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten. Dieses Gelstückchen wurde bei 65°C geschmolzen und bei 37°C zwecks Klonierung in flüssigem Zustand gehalten. Die typische Klonierungsreaktion setzte sich wie folgt zusammen:



**TA-Klonierungs-Ansatz**

Geschmolzenes Gelstückchen	2,0 µl
Salz Lösung (des pCR2.1 <sup>®</sup> -TOPO <sup>®</sup> -Vektors)	0,5 µl
pCR2.1 <sup>®</sup> -TOPO <sup>®</sup> -Vektor	0,5 µl

Der Ansatz wurde für 10 min bei 37°C inkubiert, anschließend 5 µl steriles Wasser (37°C) dazupipettiert und dann in die TOPO TOP 10 Zellen (Kap. 2.5.12) transformiert.

Eine Klonierung sehr großer PCR-Produkte in den pCR<sup>®</sup>-XL-TOPO<sup>®</sup>-Vektor (Invitrogen) erfolgte wie oben im TA-Klonierungs-Ansatz beschrieben.

**2.5.11.2 Klonierung in Expressionsvektoren pET3a/pET3a-mod**

Mit Hilfe der PCR-Primer wurde in das jeweilige „full-length“ PCR-Produkt mit den entsprechenden Expressionsprimern vor das Start-Codon (ATG) des offenen Leserahmens eine *NdeI*-Schnittstelle (pET3a; Kap.2.4) oder *XhoI*-Schnittstelle (pET3a-mod; Kap. 2.4) und hinter die Stopp-Codons des offenen Leserahmens eine *BamHI*-Schnittstelle eingefügt. Diese Restriktionsschnittstellen waren Teil der jeweiligen „multiple-cloning-site“ des entsprechenden Vektors. Somit konnte die nach der PCR über eine Silikagelmembran gereinigte DNA (Kap. 2.5.1.5) mit den dazu passenden Restriktionsenzymen *NdeI/BamHI* (pET3a) oder *XhoI/BamHI* (pET3a-mod) geschnitten und in den mit *NdeI/BamHI* linearisierten Vektor pET3a oder *XhoI/BamHI* linearisierten Vektor pET3a-mod ligiert werden. Der Restriktionsansatz eines Doppelverdaus war wie folgt zusammengesetzt:

Restriktionsansatz Insert-DNA oder pET3a-Vektor

1 µg gereinigte(r) Insert-DNA oder pET3a-Vektor	X µl
10 x Reaktionspuffer 3 (Invitrogen)	2 - 5 µl
10 U/µl <i>BamHI</i> (Invitrogen)	1,0 µl
20 U/µl <i>NdeI</i> (NEB)	0,5 µl
Wasser	ad 20 – 50 µl

Der Reaktionsansatz wurde bei 37°C für 3 h inkubiert. Die Inaktivierung der Reaktionsansätze erfolgte für 10 min bei 65°C.

Bei der Verwendung der Restriktionsenzyme *XhoI/BamHI* war ein Doppelverdaus nicht möglich, da beide Enzyme unterschiedliche Puffer für eine optimale Schneideeffizienz benötigten.

So wurde zuerst mit *Xho*I geschnitten, da der erforderliche Puffer eine geringere Salzkonzentration enthielt. Nach Zugabe des optimalen Puffers für das Enzym *Bam*HI konnte bei dessen optimaler Restriktionstemperatur inkubiert werden. Die Dauer der jeweiligen Einzelinkubationen betrug 1,5 h.

Um die Ligationseffizienz zu erhöhen wurden sowohl geschnittene Insert-DNA, als auch die jeweiligen linearisierten Vektoren zur Entfernung von Enzymen sowie Puffern aus dem Reaktionsansatz über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt (Kap. 2.5.1.4).

Entsprechende Banden wurden für die Ligation nach erfolgter Agarose-Gelelektrophorese unter UV-Licht (UV-Transilluminator M 20, Appligene) mit einem Skalpell scharf ausgeschnitten und über eine Silikagelmembrane („QIAquick Gel Extraction“-Kit, Qiagen) gereinigt (Kap. 2.5.1.5). Ein Aliquot der jeweiligen DNA und der Vektoren wurden zur UV-photometrischen Gehaltsbestimmung eingesetzt (2.5.3).

Die darauf folgende Ligation erfolgte in molaren Verhältnissen von 10 fmol geschnittenem Vektor zu 90 fmol geschnittener Insert-DNA. Die Molaritätsberechnung für 1 fmol pro ng DNA-Molekül erfolgte nach folgender Formel:

1 fmol = Anzahl der Basenpaare der Insert-DNA oder entsprechender Vektor x 308 (durchschnittliche Molare Masse einer Base) x  $10^{-6}$  ng.

#### Ligationsansatz:

Wasser	X	μl
5x DNA-Ligase-Puffer (Invitrogen)	2	μl
10 fmol geschnittene gereinigte Insert-DNA	Y	μl
30 – 90 fmol geschnittener gereinigter Vektor	Z	μl
2 U/μl T4 DNA-Ligase (Invitrogen)	1	μl
Gesamtvolumen	10	μl

Der Reaktionsansatz wurde für 90 min bei 25°C im Heizblock inkubiert und bei –18°C eingefroren oder ein Aliquot direkt zur Transformation in die geeigneten *E. coli*-Stämme XL1-Blue oder DH5α eingesetzt.

### 2.5.12 Transformation von *E. coli*-Zellen

Als Transformation wird der Prozess bezeichnet bei dem ein Bakterium ein ringförmiges DNA-Molekül (Plasmid) an seiner Oberfläche bindet und aufnimmt. Nur sogenannte kompetente Bakterienzellen sind dazu in der Lage DNA an ihrer Oberfläche zu binden und durch ihre Hülle aufzunehmen.

#### 2.5.12.1 Präparation kompetenter Zellen

Zellen der *E. coli*-Stämme DH5 $\alpha$ , XL1-Blue (Kap. 2.3.3) und BL21 (DE3) (Kap. 2.3.4) wurden nach einer Methode von COHEN *et al.* (1972), die jedoch modifiziert wurde, kompetent gemacht. Die Anzucht der Zellen erfolgte in 50 ml LB Flüssigmedium bei 37°C, 250 rpm für etwa 6 – 8 h (Optische Dichte der Bakterienkultur etwa 0,4 – 1,0 bei  $\lambda = 600$  nm). Anschließend wurden die Zellen für 10 min auf Eis gestellt und danach 10 min bei 4°C und 3000 rpm abzentrifugiert (Beckmann GS-6R; Rotor GH 3.8). Das Zellpellet wurde vorsichtig in 25 ml eiskalter 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 4°C und 3000 rpm wurde das Pellet vorsichtig in 5 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung mit 15 % Glycerin (m/v) resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde bis zum Erreichen der höchsten Kompetenz für etwa 19 – 24 h bei 4°C inkubiert. Die kompetenten Zellen wurden anschließend als 100  $\mu$ l oder 200  $\mu$ l Aliquots bei –80°C bis zum weiteren Gebrauch eingefroren.

#### 2.5.12.2 Transformation kompetenter Zellen

Die Transformation der Plasmide wurde laut Herstellervorschrift mit den jeweiligen geeigneten kompetenten Bakterienzellen durchgeführt. Die kompetenten Zellen wurden zum Auftauen auf Eis gestellt, die Transformation gliederte sich in folgende Schritte:

1. Inkubation von 5  $\mu$ l des Ligationsansatzes (2.5.11) oder 1 – 2  $\mu$ l Plasmid-DNA (ca 200 ng/ $\mu$ l) in 100  $\mu$ l kompetenten Zellen auf Eis für ungefähr 20 min
2. Hitzeschock der Zellen bei 42°C für 45 sec im Wasserbad (nicht schütteln!).
3. Sofortige Inkubation des Ansatzes für 2 min auf Eis.
4. Zugabe von 400  $\mu$ l SOC-Medium und Wachstum der Zellen zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz bei 37°C, 250 rpm für 30 min (Ampicillinresistenz) und für 60 min (Kanamycinresistenz).
5. Ausplattieren der Bakterienkultur (100 – 250  $\mu$ l) auf LB-Agarnährböden mit 50 – 100  $\mu$ g/ml Antibiotikum und Inkubation bei 37°C über Nacht.

Die Transformation neu konstruierter Plasmide für die heterologe Proteinexpression direkt in den *E. coli*-Expressionsstamm BL21 (DE3) kann eine schlechte Transformationseffizienz hervorrufen. Aus diesem Grunde wurde das Plasmid zur Vermehrung zunächst in einen der beiden kompetenten Bakterienstämme *E. coli* DH5 $\alpha$  oder XL1-Blue (2.3.3) transformiert, die keine Kopie der T7 RNA-Polymerase (2.3.4) in sich tragen und somit nicht zur Proteinexpression der Ziel-DNA fähig sind. Im Gegensatz zum *E. coli*-Expressionsstamm BL21 (DE3) zeichnen sich diese Bakterienstämme durch eine höhere Transformationseffizienz aus. Aus den positiv gescreenten Klonen (2.5.13) wurde die Plasmid-DNA isoliert und diese dann in den *E. coli*-Expressionsstamm BL21 (DE3) transformiert.

### **SOB-Medium**

Trypton	4 g
Hefeextrakt	1 g
NaCl	116,90 mg
KCl	37,28 mg
H <sub>2</sub> O	ad 200 ml
pH 7,5	
1M MgCl <sub>2</sub> (sterilfiltriert)	1 ml
1M MgSO <sub>4</sub> (sterilfiltriert)	1 ml

### **SOC-Medium**

SOB-Medium	100 ml
50 % Glukoselösung (sterilfiltriert)	0,8 ml

Alle Medien wurden vor Zugabe der sterilfiltrierten Lösungen autoklaviert.

## **2.5.13 Selektion positiver rekombinanter Klone**


Die aus Transformationen (Kap. 2.5.12) hervorgegangenen Kolonien mussten nun dahin gehend überprüft werden, ob die jeweils transformierten Plasmide die klonierte Fremd-DNA enthielten. Abhängig vom verwendeten Vektor wurden folgende hier beschriebene Selektionsmethoden verwendet.

### 2.5.13.1 Blau/Weiß Selektion

Diese Selektionsmethode wurde für das Klonieren von DNA-Fragmenten in den pCR2.1<sup>®</sup>-TOPO<sup>®</sup>-Vektor verwendet. Die Blau/Weiß Kolonieselektion basiert auf der Spaltung des künstlichen Substrates X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indol- $\beta$ -D-Galaktosid) durch  $\beta$ -Galaktosidase in den blauen Farbstoff 5-Brom-4-Chlorindigo und die Zuckerkomponente Al-lactose. Geeignete Wirtszellen (TOP 10 Zellen) enthalten in ihrem Genom lediglich den  $\omega$ -Abschnitt der  $\beta$ -Galaktosidase. Der entsprechende Vektor besitzt zur Komplettierung des Enzyms den  $\alpha$ -Abschnitt des Gens in seiner „multiple-cloning-site“ und beide Fragmente ergänzen sich zur funktionellen  $\beta$ -Galaktosidase. Der erfolgreiche Einbau der Insert-DNA in die multiple Klonierungsstelle unterbricht das  $\alpha$ -Fragment und verhindert so die Bildung der aktiven  $\beta$ -Galaktosidase, der Farbstoff kann nicht gespalten werden und die entstehenden Bakterienkolonien erscheinen weiß. Zur Ausbildung des Blau/Weiß-Selektion wurde auf den LB-Platten vorher X-Gal ausplattiert.

### 2.5.13.2 PCR-Kolonie-Screening

War eine Blau-Weiß-Selektion nicht möglich, konnte der Nachweis Insert-DNA tragender Klone mit Hilfe einer PCR erfolgen. Dafür wurden einzelne Bakterienkolonien als Template in einer PCR eingesetzt. Als Primer dienten die Expressionsprimer, die bereits zur Amplifikation der jeweiligen zu klonierenden „full-length“-cDNA herangezogen wurden. Für das Screening selbst wurden in je eine Kavität („well“) einer sterilen Mikrotiterplatte 20  $\mu$ l steriles Wasser pipettiert. Mit derselben Pipettenspitze wurde ein Klon von der LB-Platte abgenommen und durch mehrmaliges betätigen des Kolbenhubes der Pipette im Wasser des dazugehörigen „wells“ suspendiert. Von dieser Suspension wurden 10  $\mu$ l direkt in ein PCR-Gefäß pipettiert, bevor der in der Mikrotiterplatte verbliebenen Zellsuspension 100  $\mu$ l LB-Flüssigmedium zugesetzt wurden. Auf diese Weise wurden mehrere Klone untersucht, die Mikrotiterplatte bis zum Ergebnis des PCR-Screenings im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Der Aufschluß der Bakterienzellen fand im PCR-Gerät nach folgendem Programm statt:

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
96°C	15 s	-
96°C	5 min	 2
50°C	90 s	
96°C	90 s	
45°C	1 min	
96°C	1 min	
40°C	1 min	-
4°C	∞	

Anschließend wurde jedem PCR-Gefäß folgende **Vorlage** hinzugefügt:

Komponente	Volumen
Wasser	3 µl
jeweiliger Expressions forward Primer (10 µM)	1 µl
jeweiliger Expressions reverse Primer (10 µM)	1 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	5 µl

Im Anschluss erfolgte die Amplifikation des Zielgens. Zusätzlich wurde für die PCR jeweils eine Positivkontrolle mit 1 : 100 verdünnter, gereinigter cDNA und eine Negativkontrolle mit Wasser statt Bakterienzellen angesetzt:

#### Positivkontrolle:

Komponente	Volumen
Wasser	10,5 µl
gereinigte cDNA	2,5 µl
jeweiliger Expressions forward Primer (10 µM)	1,0 µl
jeweiliger Expressions reverse Primer (10 µM)	1,0 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	15,0 µl

#### Negativkontrolle:

Komponente	Volumen
Wasser	13 µl
jeweiliger Expressions forward Primer (10 µM)	1 µl
jeweiliger Expressions reverse Primer (10 µM)	1 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	15 µl

Die PCR wurde mit dem gleichen Programm wie für die Amplifikation des jeweils klonierten DNA-Fragmentes verwendet. Begonnen wurde jedoch mit einem manuellen „hot-start“, da hier normale *Taq*-DNA-Polymerase verwendet wurde.

Die Zugabe des Mastermix erfolgte nach der 5minütigen Anfangsdenaturierung.

#### Mastermix:

Komponente	Volumen
Wasser	6,125 µl
10x PCR-Puffer	2,500 µl
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0,750 µl
10 mM dNTPs	0,500 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	0,125 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>10,000 µl</b>

Nach erfolgter PCR wurden alle Ansätze über die Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und mit dem Alphaimager 1220 dokumentiert. Von allen positiv getesteten Klonen wurden die 100 µl Bakteriensuspension aus der bei 4°C gelagerten Mikrotiterplatte in 7 ml LB-Flüssigmedium mit 100 µg/ml Ampicillin pipettiert und für etwa 16 h bei 37°C inkubiert. Von den gewachsenen Bakterienkulturen wurde die Plasmid-DNA isoliert (2.5.1.3) und davon je 1,5 µl zwecks Proteinüberexpression in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. Expressionsinduktion und Ernte der Bakterienkulturen erfolgte wie nachfolgend in 2.5.14 beschrieben. Für die Expressionsanalyse wurden die bei –80°C gelagerten Bakterienzellpellets (2.5.14) auf Eis aufgetaut und in 3 ml Lysispuffer resuspendiert. Die Aufarbeitung und Analyse erfolgte wie in den Kapiteln 2.7.6 beschrieben.

#### 2.5.14 Heterologe Expression pflanzlicher cDNAs in *E. coli*

Nach erfolgter Transformation der Plasmid-DNA in den *E.coli*-Stamm BL21 (DE3) wurde von den LB-Agarplatten jeweils eine Kolonie (Klon) mit einem sterilen Zahnstocher abgeimpft und in 7 ml LB-Flüssigmedium mit 100 mg/ml Ampicillin überführt. Die Inkubation der Bakterienkulturen erfolgte bei 37°C und 250 rpm bis zum Erreichen einer OD<sub>λ=600</sub> von etwa 0,6. Zum Anlegen von Dauerkulturen wurden 750 µl der jeweiligen Bakteriensuspensionen mit 250 µl 60 % Glycerin in LB-Flüssigmedium (m/v) gemischt und bei –80°C gelagert. Zu den restlichen Bakterienkulturen wurde zur Induktion der Proteinexpression Isopropyl-β-

D-thiogalactopyranosid (IPTG; 1 mM Endkonzentration) dazugegeben und für weitere 6 h bei 37°C und 250 rpm inkubiert.

Um größere Mengen rekombinanten Proteins zu erhalten, wie sie für die Proteinreinigung oder die Enzymassays (2.7.6) benötigt wurden, wurden die jeweiligen Dauerkulturen durch Ausstreichen auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin vereinzelt und für 15 h bei 37°C inkubiert. Jeweils eine Bakterienkolonie dieses Ausstrichs wurde mit einem sterilen Zahnstocher in 7 ml LB-Flüssigmedium mit 100 µg/ml Ampicillin überimpft und über Nacht bei 37°C und 250 rpm inkubiert. 1,5 ml dieser Vorkultur wurden in 50 ml LB-Flüssigmedium mit 100 µg/ml Ampicillin pipettiert und unter gleichen Bedingungen bis zu einer  $OD_{\lambda=600}$  von 0,6 inkubiert. Nach der Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1mM) und erneuter Ampicillinzugabe (100 µg/ml) erfolgte die Expression für weitere 6 h. Danach wurden die Bakterienkulturen bei 4°C und 6000 x g für 20 min abzentrifugiert (DuPont Sorvall RC-5B, GSA-Rotor) und das Zellpellet bei – 80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

#### **2.5.14.1 Gewinnung des heterolog exprimierten Proteins**

Zur Gewinnung des in *E. coli* BL21 (DE3) heterolog exprimierten Proteins wurde das Zellpellet der Bakterienzellen auf Eis aufgetaut und in der entsprechenden Menge Lysispuffer (His-Tag-Reinigung, Kap. 2.7.5) oder DHS/HSS-Puffer (DHS/HSS-Enzymassay, Kap. 2.7.6) resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte durch Ultraschall (Branson-Sonifier Cell Disruptor B15, Standard-Mikrotip-Spitze, Pulsiereinrichtung 50 %) für 10 min. Anschließend wurde bei 4°C für 20 min mit 15.000 x g (DuPont Sorvall RC-5B, SS34-Rotor) zentrifugiert, um nicht aufgeschlossene Bakterienzellen und Zelltrümmern abzutrennen. Der Überstand wurde danach direkt zur His-Tag-Reinigung (Kap. 2.7.5) oder zum Bestimmen der DHS/HSS-Aktivität (Kap. 2.7.6) verwendet.

#### **2.5.14.2 Klonierung und Expression von His-tag-markierten Proteinen**

Zur Gewinnung spezifischer Antikörper für die Immunolokalisation war es wichtig, schnell und einfach gereinigtes rekombinantes Protein zu gewinnen. Dazu wurde ein Histidin-Tag bestehend aus sechs Histidinresten an den ORF der cDNA angefügt, das Protein anschließend über Metall-Affinitätschromatographie (2.5.14.2) gereinigt.

Mit Hilfe der PCR wurde die codierende Sequenz für 6 Histidinreste an das 3'-Ende der ORF-cDNA angefügt. Um dies zu ermöglichen wurde ein neuer Expressions Reverse Primer ent-



worfen. Dieser enthielt neben einer zum 3'-Ende der DNA komplementären Sequenz eine codierende Sequenz für den Histidin-Tag, das Stopp-Codon und eine Restriktionsschnittstelle für die Ligation in den dazu passenden Expressionsvektor.

Die spätere Expression erfordert absolute Sequenzgenauigkeit, aus diesem Grunde wurde die „full-length“-PCR mit einer *Pfx*-DNA-Polymerase durchgeführt. Gegenüber normaler *Taq*-DNA-Polymerase zeichnet sie sich durch ihre „proofreading“-Aktivität (3'-5' Exonukleaseaktivität) aus. Es erfolgte bei dieser PCR auch keine Trennung in Vorlage und Mastermix, wie es bei Verwendung der *Taq*-DNA-Polymerase üblich war. *Pfx*-DNA-Polymerase ist antikörperinaktiviert und aktiviert sich erst durch Erhitzen auf 95°C in einem sogenannten automatischen „hot-start“. Dazu wurden in ein auf Eis stehendes PCR-Reaktionsgefäß folgende in Reihenfolge angegebene Komponenten pipettiert:

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
Wasser	35,0 µl
10x <i>Pfx</i> -Amplifikations-Puffer	5,0 µl
Plasmid-DNA	3,0 µl
Expressions-Forward-Primer (10 µM)	2,0 µl
Expressions-Reverse-Primer 2 (10 µM)	2,0 µl
10 mM dNTPs	1,5 µl
50 mM MgSO <sub>4</sub>	1,0 µl
<i>Pfx</i> -DNA-Polymerase (2,5 U/µl)	0,5 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50,0 µl</b>

Die anschließende Klonierung erfolgte wie unter Kapitel 2.5.11.2 angegeben.

## 2.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten wurde von der Firma MWG Biotech durchgeführt. Dazu wurden 1,5 µg Plasmid-DNA gefällt (2.5.2.1.) und getrocknet oder die entsprechende Plasmid-DNA-Menge abpipettiert, bei Raumtemperatur getrocknet und in Eppendorfreaktionsgefäßen per Post versendet.

## 2.7 Proteinchemische Methoden

### 2.7.1 Quantifizierung von Proteinen

Die Konzentration von Proteinen wurde nach der Methode von BRADFORD (1976) bestimmt. Durch die Bindung der Proteine an den Farbstoff Coomassie-brilliant-blue G250 kommt es zu einer Absorptionsverschiebung von 465 nm nach 595 nm. Zur Konzentrationsbestimmung wurden 20 µl Probe mit 1 ml Bradford-Reagenz gemischt und die Absorption in Mikroküvetten (Schichtdicke  $d = 1$  cm) bei  $\lambda = 595$  nm am UV/VIS-Spektrometer (Ultrospec 3100 pro, Amersham Pharmacia) gemessen.

Zur Bestimmung der Kalibriergeraden wurden 0,1 bis 1,0 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA) als Referenzprotein eingesetzt.

#### BRADFORD-Reagenz

Es wurden 100 mg Serva Blau G in 50 ml absolutem Ethanol gelöst, 100 ml 85 %ige Phosphorsäure (v/v) dazugegeben und auf 1 Liter aufgefüllt. Nach der Filtration der Lösung konnte diese bei 4°C im Dunkeln gelagert werden.

### 2.7.2 Umpuffern, Entsalzen und Fällen von Proteinen

Zum Umpuffern und Entsalzen von Proteinen wurden PD-10 Säulen (GE Healthcare Biosciences) verwendet. Diese mussten vor dem Gebrauch mit 20 ml des gewünschten Puffers äquilibriert werden. Anschließend wurden 2,5 ml Proteinprobe aufgetragen und der Durchlauf verworfen. Eluiert wurde mit 3,5 ml des entsprechenden Puffers. Probenvolumina von 1 ml wurden nach komplettem Eintreten in das Gelbett mit 1,5 ml Puffer ergänzt und mit 2 ml Elutionspuffer von der Säule eluiert. Nach Spülen der PD-10 Säulen mit 20 ml Puffer und 10 ml 0,02 %iger Natriumazid-Lösung wurde die Sepharose bis zur Wiederverwendung in dem gleichen Puffer bei 4°C gelagert. Zur Beseitigung von Proteinverunreinigungen wurde die Säule zunächst mit 20 ml 0,2 M NaOH und anschließend 20 ml 0,5 M NaCl-Lösung gereinigt und regeneriert. Die Säule wurde dann bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Für die Durchführung von Western-Blots (2.8.2) war es notwendig, definierte Proteinmengen auf das SDS-Gel (2.7.3) aufzutragen. Entsprechende Aliquots der Proteinproben wurden zuerst mit 1/10 VT 0,1 % Na-Desoxycholat-Lösung (m/v) und danach mit 1/10 VT 55 % Trichloressigsäure (m/v) versetzt. Nach gründlichem Mischen wurden die Proteine über Nacht bei

4°C gefällt. Die Zentrifugation erfolgte bei 4°C und 15.300 .rpm (Sigma, 1 K15) für 30 min. Das Pellet wurde in 10 µl 1,5 M Tris-Puffer pH 8,8 resuspendiert und für die SDS-Gelelektrophorese eingesetzt.

### 2.7.3 Herstellen von SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE)

Die denaturierende SDS-Gelelektrophorese (Sodiumdodecylsulfat) trennt die Proteine nach Größe ihrer Untereinheiten. Sie wird häufig bei der Untersuchung der Proteinexpression, bei der Proteinreinigung zur Reinheitskontrolle nach den einzelnen chromatographischen Schritten, zur Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe von Markerproteinen oder als erster Schritt bei der Durchführung von Western-Blots eingesetzt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte vertikal in einem 12 %igen Trenngel. Als Elektrophoreseapparatur kam sowohl das Mini-Protean II als auch das Mini-Protean III Elektrophorese System der Firma Bio-Rad mit dem Power Supply Multidrive XL (Pharmacia) zum Einsatz.

Die Gele hatten folgende Zusammensetzung:

Komponente	Trenngel [ml]	Sammelgel [ml]
Wasser	3,3	3,40
Acrylamid-Lösung (s.u.)	4,0	0,83
1,5 M Tris-Base pH 8,8	2,5	-
1,0 M Tris-Base pH 6,8	-	0,63
10 % SDS-Lösung (m/v)	0,1	0,05
10 % Ammoniumpersulfat-Lösung (m/v)	0,1	0,05
TEMED	0,004	0,005
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>10</b>	<b>5</b>

#### Acrylamid-Lösung

Rotiphorese Gel 30 [30 % Acrylamid (m/v); 0,8 % Bisacrylamid (m/v); Verhältnis 37,5 : 1]

Nach dem Gießen und Auspolymerisieren des Trenngels wurde das Sammelgel gegossen. Die Proben wurden vor dem Auftragen im Verhältnis 1:2 mit Laemmli-Puffer versetzt, gemischt und für 5 min bei 95°C im Thermoblock inkubiert. Zur Größenbestimmung wurden 3 µl des Molekulargewichtstandard (10 kDa Proteinleiter, Life Technologies) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1x SDS-Elektrodenpuffer bei 200 V, 75 mA und einer maximalen Leistung von 15 W.

**Laemmli-Puffer**

10 % SDS-Lösung (m/v)	3,3 ml
Glycerin (wasserfrei)	2,0 ml
0,5 M Tris-Puffer (pH 6,8)	1,0 ml
$\beta$ -Mercaptoethanol	0,5 ml
0,5 % Bromphenolblau-Lösung (m/v)	0,5 ml
Wasser	ad 10,0 ml

**10x SDS-Elektrodenpuffer**

Glycin	144 g
Tris-Base	30 g
SDS	10 g
Wasser	ad 1000 ml
pH 8,3	

**1x SDS-Elektrodenpuffer** wurde vor Gebrauch durch 1:10-Verdünnung aus 10x SDS-Elektrodenpuffer angesetzt

**2.7.4 Proteinfärbungen****2.7.4.1 Coomassie Färbung**

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine durch eine SDS-PAGE wurden die Trenngele zur Kontrolle der Expression oder der Proteinreinheit mit Coomassie-Blau-Lösung gefärbt. Nach einstündiger Färbung auf dem Schüttler wurden die Gele 30 min in Entfärber I und danach 2 – 3 Stunden in Entfärber II entfärbt. Die während der Färbung ausgefällten Proteine waren im Trenngel nun als blau-gefärbte Banden sichtbar und mit dem Alphaimager 1220 dokumentiert.

**Coomassie-Blau-Lösung**

Methanol	100 ml
1 %ige Coomassie Brilliant Blue R-250-Lösung (m/v)	25 ml
Eisessig	20 ml
Wasser	ad 200 ml

Zusammensetzung der Entfärber:

<b>Komponente</b>	<b>Entfärber I [ml]</b>	<b>Entfärber II [ml]</b>
Methanol	100	10
Eisessig	20	14
Wasser	ad 200	ad 200

#### 2.7.4.2 Indian Ink Färbung

Protein-Blot-Membranen, die z.B. für den Western-Blot verwendet wurden, wurden nach dem Blotten grundsätzlich mit Indian Ink gefärbt. Diese von HANCOCK und TSANG (1983) beschriebene und von OBER (1997) modifizierte Methode hat gegenüber der Coomassie Färbung den Vorteil einer höheren Sensitivität (Nachweisgrenze ca 10 ng pro Proteinbande). Auch geringere Kosten und die einfache Entsorgung gegenüber Färbungen mit Silber zeichnen diese Methode aus.

Die Protein-Blot-Membranen (IMMOBILON P-PVDF-Membran, Millipore) wurden kurz in 1x TBS-T gespült und danach zweimal für 10 min in 1x TBS-T gewaschen. Die Färbung in der Indian-Ink-Lösung erfolgte für mindestens 1 h auf dem Schüttler. Abschließend wurde die Membran für 15 min in Wasser gewaschen, an der Luft getrocknet und unter Auflicht mit dem Alphaimager 1220 dokumentiert.

#### Indian Ink-Lösung

1x TBS-T	100,0 ml
Eisessig	1,0 ml
Fount India-Tinte (Pelikan)	0,1 ml
vor Gebrauch Filtrieren!	

#### 2.7.5 His-Tag-Reinigung

Eine effektive Methode zur Proteinreinigung in nur einem Schritt ist die Immobilisierte-Metall-Ionen-Affinitäts-Chromatographie (IMAC). PORATH *et al.* (1975) setzten sie zum ersten mal ein und HOCHULI *et al.* (1987) konnten sie durch die Entwicklung und den Einsatz des neuen Liganden Nitrilo-Tri-Essigsäure (NTA) in ihrer Effizienz weiter optimieren. Der Ligand NTA ist an Sepharose CL-6B gekoppelt. Mit vier von seinen insgesamt sechs koordinierenden Bindungsstellen geht das  $\text{Ni}^{2+}$  stabile Interaktionen mit dem Liganden ein (Ni-NTA-Agarose, Qiagen). Die anderen zwei verbleibenden  $\text{Ni}^{2+}$ -Bindungsstellen stehen somit für die Bindung der Histidin-Reste von Proteinen zur Verfügung. Gebundene Proteine können einerseits über Protonierung der Histidinreste, durch Absenken des pH-Wertes, andererseits durch kompetitive Verdrängung mit Imidazol, wie sie bei der Reinigung der überexprimierten, rekombinanten HSS (Kap. 2.8) aus *Cynoglossum officinale* angewendet wurde, eluiert werden.

Die 6xHis-Tag-Proteine wurden unter nativen Bedingungen nach einer am Institut für Pharmazeutische Biologie modifizierten Protokoll der Firma Qiagen (The Qiaexpressionist 01/2000) gereinigt.

In eine leere Hülse PD-10-Säule (GE Healthcare) mit Fritte wurden 2 ml gleichmäßig suspendierte Ni-NTA-Agarose (Qiagen) pipettiert (entspricht etwa 1 ml Gelbettvolumen) und mit 30 ml Lysispuffer äquilibriert. Sowohl dieser Lysispuffer als auch der später verwendete Waschpuffer enthielten zur Reduktion unspezifischer Proteinbindungen an das Säulenmaterial bereits eine bestimmte Menge Imidazol. Eine Elution des Proteins fand bei diesen geringen Imidazolkonzentrationen nicht statt. Der unter 3.5.14 erhaltene Proteinrohextrakt wurde für mindestens 90 min bei 4°C oder über Nacht bei selbiger Temperatur auf dem end-over-end Schüttler in der PD-10-Hülse an das Säulenmaterial gebunden. Alle weiteren Arbeitsschritte fanden ebenfalls bei 4°C statt. Der Durchlauf wurde aufgefangen und die Säule 3x mit 5 ml Waschpuffer gespült. Eluiert wurde durch Zugabe von 5x 1 ml Elutionspuffer, die resultierenden Elutionsfraktionen wurden getrennt gesammelt. Jeweils ein Aliquot (10 µl) jeder Fraktion wurde in einem SDS-Gel analysiert und mit Coomassie-Blau-Lösung gefärbt (s. Kap. 2.7.3 und 2.7.4.1). Die reinsten Elutionsfraktionen wurden vereinigt und bis zur Immunisierung bei – 20°C gelagert.

Zur Regeneration wurde die Ni-NTA-Säule mit 30 ml Essigsäure gespült. Anschließend wurde mit 30 ml 30 %igem Glycerol in Wasser (m/v) und 30 ml Wasser gewaschen. Die Ni-NTA-Matrix bei 4°C in 30 % igem Ethanol gelagert.

<b>Komponente</b>	<b>Lysispuffer</b>	<b>Waschpuffer</b>	<b>Elutionspuffer</b>
NaCl	300 mM	300 mM	300 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM	50 mM	50 mM
Imidazol	10 mM	40 mM	200 mM
pH-Wert	8,0	8,0	8,0

### 2.7.6 Enzymassays

Die heterolog exprimierten Proteine wurden über ihre Aktivitäten in einem DHS- und HSS-Enzym-Assay identifiziert. Das DHS-Assay weist die Modifikation eines spezifischen Lysinrestes im eIF5A-Vorläuferprotein zu Desoxyhypusin nach, die durch die DHS katalysiert wird. Dabei wird die mit <sup>14</sup>C-markierte Aminobutyleinheit eines Spermidins auf das eIF5A-Vorläuferprotein übertragen. Das HSS-Assay hingegen weist Homospermidine nach, das

durch die HSS gebildet wird. Dabei wird die Aminobutyleinheit des Spermidins auf das  $^{14}\text{C}$ -markierte Substrat Putrescin übertragen.

In einigen Fällen zeigt die DHS jedoch eine zusätzliche HSS-Aktivität, wobei die HSS im HSS-Assay nur die Synthese von Homospermidin katalysiert. Die Vorbereitung der DHS- und HSS-Assays wurde wie folgt durchgeführt. Heterolog exprimierte Proteine wurden wie unter 2.5.14.1 erhalten und eingesetzt.

### 2.7.6.1 HSS-Assay

Die HSS-Aktivität wurde über die Quantifizierung des radioaktiv markierten Produktes Homospermidin im Verhältnis zu den nicht umgesetzten Substraten [ $^{14}\text{C}$ ]Putrescin und [ $^{12}\text{C}$ ]Spermidin bestimmt. Homospermidin entsteht durch Übertragung der Aminobutyleinheit des Spermidins auf das radioaktiv markierte Substrat Putrescin. Der Standardansatz zur Bestimmung der Homospermidinsynthaseaktivität wurde folgendermaßen angesetzt:

#### Reaktionsansatz des HSS-Assay

[ $^{14}\text{C}$ ]Putrescin (0,125mM)	2 $\mu\text{l}$ (0,05 $\mu\text{Ci}$ )
[ $^{12}\text{C}$ ]Putrescin (5 mM)	2 $\mu\text{l}$
Spermidin (5 mM)	2 $\mu\text{l}$
NAD <sup>+</sup> (25mM)	2 $\mu\text{l}$
DHS-/HSS-Puffer pH 9,5	2 $\mu\text{l}$
entsalzte Proteinprobe	15 $\mu\text{l}$ (Zugabe zum Starten des Assay nach Vorinkubation)

Der Reaktionsansatz wurde für 5 min bei 30°C in einem Thermoblock vorinkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe der entsalzten Enzymprobe (Kap. 2.5.14.1) gestartet. Je nach Enzymaktivität wurden nach verschiedenen Zeitintervallen (zwischen 5 und 30 min) 8  $\mu\text{l}$  Aliquots des Reaktionsansatzes auf DC-Platten (Kieselgel 60 F254, Merck) pipettiert und damit gestoppt. Radioaktiv markiertes Substrat und Produkt wurden anschließend in einer mobilen Phase bestehend aus Aceton, Methanol, Ammoniak (25 %) im Verhältnis 40:30:20 (v/v/v) (TOPPEL *et al.*, 1987) getrennt. Nach erfolgter Trennung und vollständigem Trocknen der DC-Platte unter dem Abzug (kein Ammoniakgeruch mehr wahrnehmbar) wurde sie mit dem Rapid Intelligence TLC Analyser (RITA) der Firma Raytest ausgewertet. Das Zählgas des Geiger-Müller-Zählrohres war ein Argon-Methan-Gemisch 90:10 (Westfalen Gas).

### 2.7.6.2 DHS-Assay

Die DHS-Aktivität wurde enzymatisch durch die Übertragung eines radioaktivmarkierten Aminobutylrestes des Spermidins auf einen spezifischen Lysinrest des eIF5A-Vorläuferproteins bestimmt. Der Standardansatz zur Bestimmung der Desoxyhypusin-Synthaseaktivität setzte sich wie folgt zusammen:

#### Reaktionsansatz des DHS-Assay

[ <sup>14</sup> C]Spermidin (0,125mM)	4,0 µl (0,05 µCi)
[ <sup>12</sup> C]Spermidin (0,5 mM)	3,0 µl
eif-Sv* (7,5 mg/ml)	4,6 µl
NAD <sup>+</sup> (25mM)	4,0 µl
entsalzte Enzymprobe	30,0 µl (Zugabe zum Starten des Assay nach Vorinkubation)
DHS-/HSS-Puffer pH 9,5	4,4 µl

eif-Sv = eIF5A Vorläuferprotein isoliert aus *S. vernalis* (OBER und HARTMANN, 1999b)

Nach 5 min Vorinkubation des Reaktionsgemisches bei 30°C im Thermoblock wurde die Reaktion durch die Zugabe der entsalzten Enzymprobe gestartet. Die Enzymreaktion wurde nach 1 -1,5 h Inkubation bei 30°C durch die Zugabe von 10 µl 1M Kaliumphosphatpuffers mit 60 mM Spermidine (pH 6,3) gestoppt. Dadurch sinkt der pH-Wert des Assay auf etwa pH 6,7, einem Wert, wo Spermidin am wenigsten unspezifische Bindungen mit Proteinen und Nukleinsäuren eingeht (TAO *et al.*, 1994). Die gestoppte Enzymreaktion wurde komplett von Whatman-Papierstückchen aufgesogen, und das Protein durch die Inkubation der Probe für 10 min bei 95°C in 250 µl 10 %iger Trichloressigsäure mit 10 mM Spermidine gefällt. Um nicht kovalent gebundenes [<sup>14</sup>C] Spermidin erfolgreich zu entfernen wurde zunächst 4x 10 min mit je 3 ml 0,2 M HCl, dann 2x 10 min mit je 3 ml 70 % Ethanol gewaschen. Nach dem vollständigen Trocknen des Whatman-Papiers wurde es in Plastik-Szintillationsgefäße überführt, mit 3ml hydrophilem Aquasafe<sup>®</sup>-Szintillation-Cocktail (Zenker) überschichtet und gründlich durchmischt. Um die an das eIF5A kovalent gebundene Radioaktivität im Whatman-Papier zu bestimmen wurde die Probe in einem Szintillationszähler (Phillips PW 4700) für jeweils 2 min vermessen.



## **2.8 Immunologische Methoden**

### **2.8.1 Immunisierung**

Für die Gewinnung polyklonaler Antikörper gegen die jeweilige HSS wurde je 1 mg der unter 2.7.5 gereinigten HSS über PD-10 Säulen (Amersham Pharmacia) auf 5 mM  $K_2HPO_4$ -Puffer pH 8,0 umgepuffert (2.7.2). Proteinmengen zu 1 x 500  $\mu$ g und 2 x 250  $\mu$ g wurden aliquotiert, gefriergetrocknet (Gamma 1-20 Gefriertrocknung, Christ) und zur Auftragsimmunisierung der Firma Bioscience (Göttingen) zugeschickt. Es wurden uns je Immunisierung vier Seren zugesandt. Zum einen das Präimmunserum, das dem Kaninchen vor der Immunisierung entnommen wurde und somit keine Immunantwort gegen die HSS zeigen durfte. Überprüft wurde dies in den entsprechenden Western-Blots. Es folgten die zwei Testseren „first bleeding“ und „second bleeding“, die vor den entsprechenden Boosterungen (mit je 250  $\mu$ g des Proteins) entnommen wurden und letztlich das „final bleeding“, welches aus dem Kaninchen nach allen Immunisierungen gewonnen wurde und somit die meisten HSS-spezifischen Antikörper enthalten sollte. Auch dies wurde durch Western-Blot Untersuchungen überprüft.

### **2.8.2 Western-Blot**

Um in verschiedenen pflanzlichen Geweben den Ort und die Intensität der Proteinexpression zu untersuchen, wurden Western-Blots durchgeführt. Der Nachweis der untersuchten HSS erfolgte dabei mit dem jeweiligen spezifischen Antikörper.

#### **Isolierung des dafür notwendigen löslichen Proteins**

Frische oder tiefgefrorene Pflanzenproben wurden in flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill zu einem feinen Pulver zerrieben. Diesem wurde zur Extraktion des Gesamtproteins, 1 x PBS-Puffer, der 2,5 % (m/v) Polyclar AT und 2,5 % (m/v) Na-Ascorbat enthielt, zugesetzt und auf Eis unter ständigem Rühren für 30 min inkubiert. Das wasserunlösliche Polyclar AT diente der Bindung von Polyphenolen, wie Gerbstoffen: Das Na-Ascorbat sollte als Antioxidans die Bildung von quervernetzten Polyphenolen durch Phenoloxidasen verhindern. Durch 30 minütige Zentrifugation bei 4°C und 15.300 rpm (Sigma, 1 K15) wurden unlösliche Zellbestandteile und Polyclar AT abgetrennt. Im Überstand waren alle löslichen Proteine enthalten, deren Konzentration wie unter 2.7.1 beschrieben bestimmt wurde. Wurden die Extrakte nicht sofort weiter untersucht, wurden sie bis zur weiteren Verwendung bei – 20°C gelagert.

### Semi-Dry-Elektroblot

Die Auftrennung der Proteinproben erfolgte über die SDS-Gelelektrophorese (2.7.3). Die aufgetrennten Proteine im Trenngel wurden auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (Immobilon P, Millipore) transferiert.

Die auf Trenngelgröße zurechtgeschnittene Membran (6 cm hoch und 9 cm breit) wurde zunächst mit Methanol benetzt und dann zusammen mit vier Lagen Whatman-Papier derselben Größe in 1 x Blotpuffer äquilibriert. Der Aufbau des Blots erfolgte luftblasenfrei, es war darauf zu achten das alle verwendeten Komponenten (Whatman-Papier, PVDF-Membran und Trenngel) ausreichend mit 1 x Blotpuffer benetzt wurden.

Der Aufbau des Blots (von oben nach unten) ist hier in Stichpunkten dargestellt:

#### oben

Anode (Plus-Pol, obere Graphitplatte)

2 Lagen Whatman-Papier

PVDF-Membran (Immobilon P, Millipore)

SDS-Trenngel

2 Lagen Whatman-Papier

Kathode (Minus-Pol, untere Graphitplatte)

#### Unten

Der Proteintransfer erfolgte bei 120 mA und einer ansteigenden Spannung von 5 – 15 V für eine Stunde.

Folgende Puffer wurden eingesetzt:

#### 10x Blotpuffer

Tris-Base	58,0 g
Glycin	29,0 g
SDS	3,7 g
Wasser	ad 1000 ml

#### 1x Blotpuffer

10x Blotpuffer	10,0 ml
Methanol	20,0 ml
Wasser	ad 100 ml

### Immunodetektion und Exposition

Nach Abbau des Blots wurde die PVDF-Membran für 1 h in einer Lösung bestehend aus 5 % (m/v) Milchpulver (Roth) in 1x TBS-T auf dem end-over-end Schüttler inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Die Lösung wurde erneuert und darin der jeweilige

affinitätsgereinigte polyklonale Antikörper 1:5000 bis 1:10000 verdünnt, bevor die enthaltene Membran für eine weitere Stunde schüttelnd inkubiert wurde. Es folgten drei Waschschrte mit 1x TBS-T (jeweils 7 min), danach wurde die Membran mit einem 1:3300 verdünnten Goat-Anti-Rabbit Antikörper (Dianova), der an eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war, wie oben beschrieben, inkubiert (1 h). Anschließend wurde wieder dreimal 7 min mit TBS-T gewaschen und die Membran 5 min in 1x PBS äquilibriert. Mit dem „ECL Western Blotting Detection Reagent“-Kit (Amersham, Biosciences) wurde die Membran entwickelt. Das zugeetzte Substrat Luminol wird dabei durch die am sekundären Antikörper konjugierte Meerrettich-Peroxidase oxidativ gespalten und das dadurch emittierte Licht mit einem Röntgenfilm detektiert. Dazu wurde die Substratlösung zu gleichen Teilen aus den zwei Komponenten des Kits gemischt. Die Membran wurde bei Raumtemperatur für 1 min in dieser Substratlösung inkubiert. Nach Abtropfen des Substrates wurde die Membran zwischen zwei mit Ethanol gesäuberte Plastikfolien gelegt, bevor Röntgenfilme für 1-10 min aufgelegt wurden. Die Filme wurden im Anschluß an die Exposition mit RP X-OMAT developer/ replenisher (Codak) entwickelt und mit RP X-OMAT L0 fixer/replenisher (Codak) fixiert. Die Membran wurde nach der Detektion des Proteins mit Indian-Ink-Lösung (2.7.4.2), das SDS-Trenngel nach dem Blotten mit Coomassie-Blau-Lösung (2.7.4.1) angefärbt, um festzustellen, ob ein erfolgreicher Proteintransfer auf die Membran stattgefunden hat.

Folgende Puffer kamen zur Anwendung:

**10x TBS (Tris-buffered saline)**

NaCl	80,0 g
Tris-Base	30,0 g
KCl	2,0 g
Wasser	ad 1000 ml
pH 8,0	

**1x TBS-T**

10x TBS	50,0 ml
Tween 20	0,5 g
Wasser	ad 500 ml

**10x PBS (Phosphate-buffered saline)**

NaCl	80,0 g
KCl	2,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14,4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,4 g
Wasser	ad 1000 ml
pH 7,2	

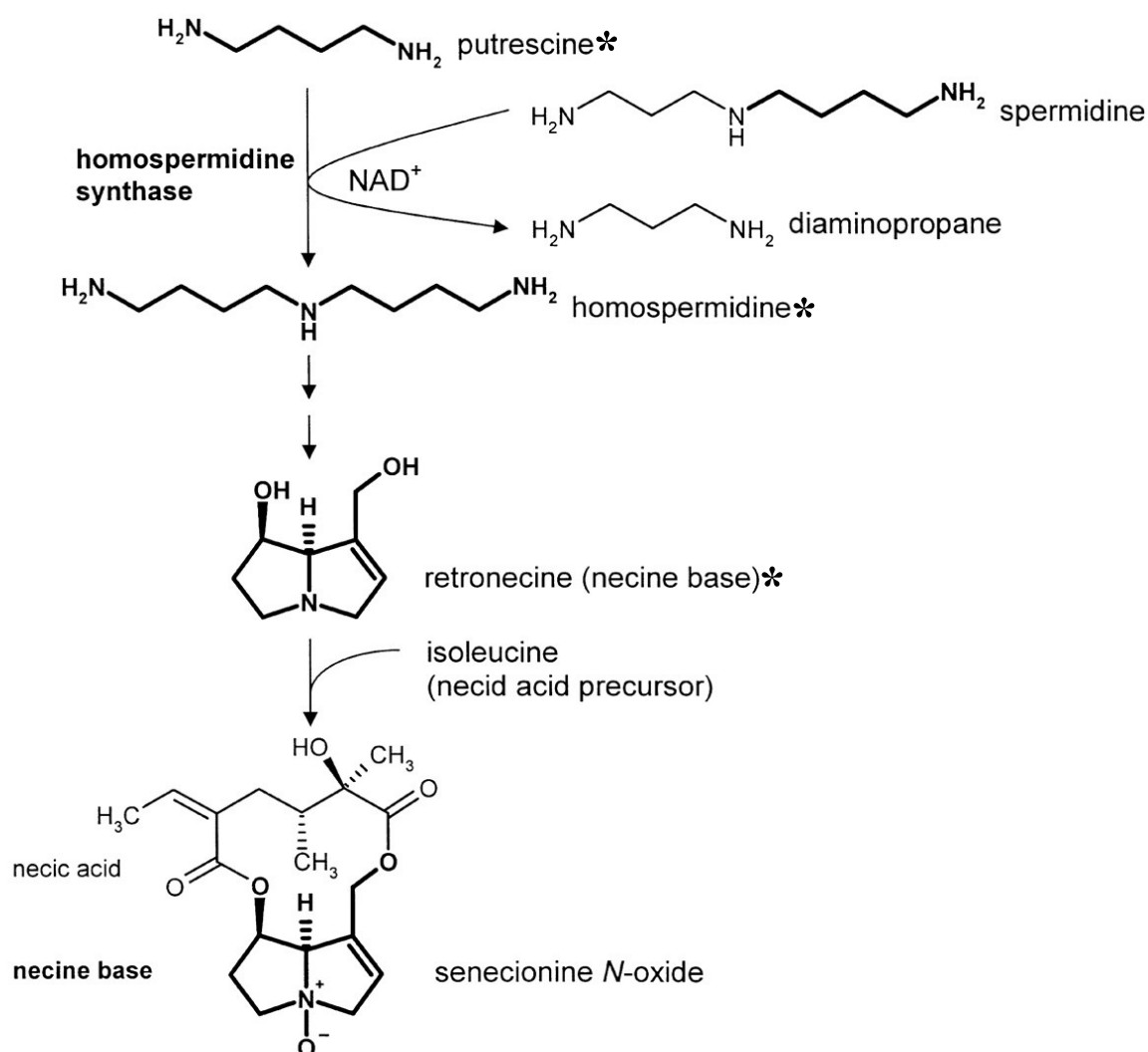
**1x PBS-T**

10x PBS	50,0 ml
Tween 20	0,5 g
Wasser	ad 500 ml

## 2.9 Radiochemische Untersuchungen

### 2.9.1 Tracerversuche mit Frischpflanzen

Um eine mögliche PA-Biosynthese in den Blättern von *S. officinale* nachzuweisen, wurden Tracerexperimente mit [ $^{14}\text{C}$ ]Putrescin durchgeführt. Wie in Abb. 2.2 gezeigt, überträgt die HSS in einer  $\text{NAD}^+$ -abhängigen Reaktion einen Lysinrest des Spermidins auf das von den Blättern aufgenommene [ $^{14}\text{C}$ ]Putrescin, wobei Diaminopropan abgespalten wird und radioaktiv markiertes Homospermidin entsteht. Homospermidin unterliegt keinem Abbau und wird komplett in die Necinbase z.B. Retronecin der artspezifischen PAs vom Lycopsamintyp eingebaut (FRÖLICH, 1996).



**Abb. 2.2: Biosynthese von PAs am Beispiel von Senecionin N-Oxid.** Die HSS katalysiert dabei den ersten spezifischen Schritt, die Biosynthese des Necinbasengrundkörpers, das gemeinsame Grundgerüst aller PAs, wie auch beim Senecionin N-Oxid [modifiziert nach REIMANN et al. (2004)].

\*: radioaktiv markiert

Junge, mittelalte und alte Blätter von *S. officinale* (Azrneipflanzengarten des Institutes) wurden zum Zeitpunkt der Blüte der Pflanze am Blattstiel mit einem scharfen Skalpell schräg (zur besseren Flüssigkeitsaufnahme) abgeschnitten und in ein Eppendorfreaktionsgefäß mit 200 µl Wasser, versetzt mit [ $^{14}\text{C}$ ]Putrescin als Tracer, gestellt. In jedem Ansatz befanden sich 2,5 µCi [ $^{14}\text{C}$ ]Putrescin (Endkonzentration im Ansatz 117 µM). Nach vollständiger Aufnahme des Tracers (ca. 24 h) wurden die Blätter bis zu 11 Tage in tracerfreiem Wasser nachinkubiert. Die Durchführung der Tracerversuche erfolgte bei hoher Luftfeuchte in einer Plastikschiene mit transparentem Deckel und angefeuchteten Cellulosepapier, um ein vorzeitiges Welken der abgeschnittenen Blätter zu vermeiden.

Zur Extraktion der radioaktiv markierten und nicht radioaktiv markierten PAs, die in den Boraginaceae (*C. officinale*, *H. indicum* und *S. officinale*) in Form ihrer *N*-Oxide vorliegen (FRÖLICH, 1996), wurden die Blätter zunächst in Methanol gemörsert (je 10 µl Aliquot zur Radioaktivitätsbestimmung und Dünnschichtchromatographie), das Methanol verdampft und der Rückstand in 1 M HCl aufgenommen. Nach Zugabe von etwas Zinkstaub wurde über 3 h unter ständigem Rühren im Säuren (pH-Wert kontrollieren) reduziert (Entstehen von Gasblasen, Aufschäumen vermeiden), die im Extrakt enthaltenen *N*-Oxide dabei zu tertiärem Alkaloid umgewandelt. Nach Zugabe von  $\text{NH}_3$ -Lösung (pH-Wert 10–12) wurde der Ansatz auf eine Extrelut-Säule (Fa Merck) gegeben und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert (einziehen lassen). Anschließend wurden mit Dichlormethan die tertiären Alkaloide eluiert. Nach dem Abrotieren des Dichlormethan wurde der Rückstand in Methanol aufgenommen (Abnahme von Aliquots von ca 5–10 µl zur Radioaktivitätsbestimmung und Dünnschichtchromatographie). Der Methanolextrakt wurde in ein dickwandiges, dicht verschließbares Glasgefäß (Wheaton-Glas) überführt und eingeeengt. Nach Zugabe von 10 %iger NaOH wurden die Proben für 2 h bei 95°C im Wasserbad hydrolisiert, um die Säurereste der Alkaloide von der Base (Retronecin) zu trennen. Danach wurden die Proben mit Ethylacetat ausgeschüttelt (Abnahme von Aliquots von ca 5–10 µl zur Radioaktivitätsbestimmung und Dünnschichtchromatographie).

Zur Bestimmung der Gesamtradioaktivität wurden etwa 5 µl Aliquot in Plastik-Szintillationsgefäße überführt, mit 3ml hydrophilem Aquasafe<sup>®</sup>-Szintillation-cocktail (Zenker) überschichtet, gründlich durchmischt und mit einem Szintillationszähler (Phillips PW 4700) 2 min vermessen.

Die Detektion der  $^{14}\text{C}$ -markierten Basen (z.B. Retronecin) erfolgte auf DC-Platten (Kieselgel 60 F254, Merck). Dazu wurde ein jeweiliges Aliquot (ca. 5 µl) der zu analysierenden Probe

auf die Platte pipettiert. Die Substanzen wurden anschließend in einer mobilen Phase bestehend aus einem Tropan-Alkaloid-Fließmittel getrennt und danach durch Rapid Intelligence TLC Analyser (RITA) der Firma Raytest ausgewertet. Das Zählgas des Geiger-Müller-Zählrohres war ein Argon-Methan-Gemisch 90:10 (Westfalen Gas).

### **Tropan-Alkaloid-Fließmittel**

Ethylacetat	45 ml
2-Propanol	35 ml
NH <sub>3</sub> (25%)	20 ml

Die Entwicklung der DC-Platten erfolgte bei Raumtemperatur und mit Kammersättigung.

## **2.10 Computerunterstützte Sequenzanalyse**

Die Analyse von Nukleinsäure- und Proteinsequenzen erfolgte entweder mit Hilfe von Computerprogrammen, die zum GCG-Softwarepaket (Wisconsin Computer) gehören oder über Programme, die über das World Wide Web jedem Benutzer zur freien Verfügung stehen. Mit den folgenden Anwendungen und Programmen wurden Sequenzanalysen betrieben:

**GCG-Softwarepaket** (Fa. Wisconsin Computer): Software zur Analyse von Nukleinsäure- und Proteinsequenzen

**GWDG** (Gesellschaft für wissenschaftliche Datenverarbeitung, Göttingen; <http://www.gwdg.de>)

**BLAST<sup>®</sup>**

*Basic Local Alignment Search Tool*, vergleicht Nukleinsäure- und Proteinsequenzen mit Sequenzen aus verschiedenen Datenbanken

**NCBI** (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

**PubMed**: ermöglicht den Zugang zu biomedizinischen Abstracts

**Restriction Mapper**

ein Programm zur Erstellung von Restriktionsschnittstellen innerhalb einer Nukleotidsequenz;

<http://www.arabidopsis.org/cgi-bin/patmatch/RestrictionMapper.pl>

<b>GeneDoc</b>	zur Erstellung multipler farbiger Sequenzalignments für Windows <a href="http://www.psc.edu/biomed/genedoc/">http://www.psc.edu/biomed/genedoc/</a>
<b>ClustalX</b>	Programm zur Erstellung von Sequenzalignments. Legt die Sequenzen so untereinander, dass Identitäten, Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Basenabfolge schnell zu erkennen sind <a href="http://www.inn-prot.weizmann.ac.il/software/ClustalX.html">http://www.inn-prot.weizmann.ac.il/software/ClustalX.html</a> <a href="http://www.igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/ClustalX/Top.html">http://www.igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/ClustalX/Top.html</a>
<b>TreeView</b>	Programm zur Darstellung von Phylogenien. Es wurde benutzt um Cladogramme und Phylogramme anzeigen zu lassen <a href="http://www.taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html">http://www.taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html</a>

## 2.11 Promotorsequenzanalyse

Im Rahmen der Arbeit sind Nukleotidsequenzen potentieller Promotoren von DHS- und HSS-codierenden Genen auf das Vorhandensein *cis*-regulatorischer Elemente untersucht worden. Die Analysen wurden mit online verfügbaren bioinformatischen Programmen aus der Gruppe der Regulatory Sequence Analysis Tools (RSAT) durchgeführt (van HELDEN, 2003).

### 2.11.1 Matrizenbasierte Sequenzanalyse unter Verwendung von "patser matrices"

Zur Identifizierung putativer Transkriptionsfaktorbindungsstellen (TFB-sites) in den potentiellen Promotoren benötigt man Matrizen bekannter TFB-sites zur Analyse. Unter der Web-Adresse <http://134.169.87.92/patser.php> (Patser Website) sind Alignment-Matrizen für zahlreiche bereits bekannte Transkriptionsfaktorbindestellen verfügbar. Es wurden 47 Matrizen aus 15 Klassen in die Analyse einbezogen, die TFB-sites im *Arabidopsis thaliana* Genom detektieren, zuzüglich einer TATA-Box-Matrize nach SHAHMURADOV *et al.* (2003). Die Matrizen sowie die entsprechenden Referenzen sind in der AthaMap-Datenbank annotiert (STEFFENS *et al.*, 2004 und 2005). In 2.3 sind die Namen der Transkriptionsfaktor-Klassen und die Namen der dazugehörigen Faktoren, aus deren Bindungsstellen die verwendeten Matrizen abgeleitet sind, aufgeführt. Auf das Vorhandensein potentiell *cis*-regulatorischer Elemente wurden jeweils 1000 bp upstream des Start-ATGs der folgenden Gene untersucht: *Svhss1*, *Svdhs*, *Ntdhs*, *Svhss2* und *Atdhs*. Die Sequenz *Svhss2* beruht auf Vorhersage, da keine cDNA-

Sequenz verfügbar war. Die Herkunft der potentiellen Promotoren ist der Tabelle 2.2 zu entnehmen.

**Tabelle 2.2: Herkunft der zur Verfügung gestellten potentiellen Promotoren**

Gen	Spezies	Sequenzlänge in bp	Herkunft
<i>Svhss1</i>	<i>Senecio vernalis</i>	1999	Dietrich Ober
<i>Svdhs</i>	<i>Senecio vernalis</i>	3071	Dietrich Ober
<i>Ntdhs</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	3402	Dietrich Ober
<i>Athss</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4516	<i>Arabidopsis</i> Homepage
<i>Cohss</i>	<i>Cynoglossum officinale</i>	464	Andreas Reimann
<i>Hihss</i>	<i>Heliotropium indicum</i>	464	Andreas Reimann
<i>Sohss</i> (Steril- kultur)	<i>Symphytum officinale</i>	464	Andreas Reimann
<i>Sohss</i> (Garten- pflanze)	<i>Symphytum officinale</i>	464	Andreas Reimann

Zu diesem Zweck wurden Sequenzen (Tab. 2.2) auf der RSAT Website (<http://rsat.ulb.ac.be/rsat/>) mit den Matrizen von der Patser-Internetseite durchsucht. Dabei wurden die voreingestellten Parameter im "patser matrices" Web-Interface der RSAT Website weitestgehend unverändert übernommen. Das AT:GC-Verhältnis wurde auf 0,325:0,175 angepasst, welches dem von *A. thaliana* als pflanzlichem Modellorganismus entspricht. Darüber hinaus wurde der „weight score“ im Feld "lower threshold estimation" auf den abgerundeten „numerically calculated cutoff score“ der entsprechenden Matrix eingestellt. Diesen erhält man indem auf der Patser Website die jeweiligen Alignment Matrizen in „weight matrices“ umgerechnet werden (HERTZ und STORMO, 1999). Ergab die Suche zunächst keinen Treffer, wurde der „weight score“ um eins reduziert um den besten Treffer zu ermitteln



**Tabelle 2.3: Bekannte pflanzliche Transkriptionsfaktorbindungsstellen (Quelle: <http://rsat.ulb.ac.be/rsat/>), deren zugehörige Matrizen in der matrizenbasierten Sequenzanalyse Verwendung fanden.**

Transkriptionsfaktor-Klassen	Zugehörige Transkriptionsfaktoren
bZIP	ABF1, bZIP910[1], bZIP910[2], bZIP911[1], bZIP911[2], TGA1, O2
bHLH	PIF3[1], PIF3[2]
DOF	DOF1, DOF2, DOF3, PBF
MADS	AG, AGL3, AGL15
AP2/EREBP	ABI4[1], ABI4[2], ANT, RAV1[2] TEIL, DRF1, CBF1
MYB	AtMYB15, AtMYB77, AtMYB84, CDC5, GAMYB, MYB.PH3[1], MYB.PH3[2], P, NtMYBAS
Trihelix	SBF1
TCP	PCF2, PCF5
HD-Kn	HVH21
HD-PHD	ALFIN1
HD-ZIP	ATHB1, ATHB5, ATHB9, HAHB4
GATA	AGP1
WRKY	ZAP1
C2H2 (Zn)	ID1
Auxinresponse-Faktor	ARF1

### 2.11.1.1 Sequenzvergleichende Promotor-Analyse mit dem Programm "consensus"

Zur Identifizierung konservierter DNA-Motive innerhalb der putativen Promotorsequenzen diente das Programm "consensus", welches online unter der Web-Adresse <http://rsat.ulb.ac.be/rsat/> zur Verfügung steht. Es wurden die potentiellen Promotoren der Gene *Cohss*, *Hihss*, *Sohss* (Sterilkultur), *Sohss* (Gartenpflanze), *Svhss1*, *Svdhs*, *Ntdhs* und *Atdhs* (Tab. 2.2) analysiert. Das Programm detektiert im verwendeten Datensatz Motive ähnlicher Sequenz nach Vorgabe der Motivlänge. Hierzu wurden im Web-Interface je 464 bp Sequenz upstream des Transkriptionsstartes eingegeben. Die Einschränkung auf 464 bp ergab sich aus der Länge der putativen Promotorsequenzen von *S. officinale*; Für eine sinnvolle Untersuchung müssen in den Analysen Sequenzen identischer Länge verwendet werden. Die Suche nach konservierten DNA-Motiven wurde für Motivlängen von 6 bis 10 bp in Ein-Basenpaarschritten durchgeführt. Hierbei wurden alle Promotoren gleichzeitig und getrennt nach DHS- und HSS-Promotoren analysiert. Die voreingestellten Standardparameter wurden unverändert übernommen. Die Ausgabe des Ergebnisses erfolgt in Form von Alignment-Matrizen (HERTZ und STORMO, 1999), die das jeweils identifizierte Motiv in den analysierten Sequenzen repräsentieren.

### 3. Ergebnisse

Vergleichende Sequenzanalysen zwischen der Homospermidinsynthase (HSS), dem Eingangsenzym der PA-Biosynthese und der Desoxyhypusinsynthase (DHS), einem Enzym des Primärstoffwechsels, zeigten, dass beide Enzyme eng miteinander verwandt sind (OBER und HARTMANN 1999b, 2000). Da die Pyrrolizidinalkaloide (PAs) innerhalb der Pflanzenfamilien der Angiospermen nur sporadisch auftreten stellte sich die Frage, ob die Rekrutierung der HSS aus der DHS nur einmal (monophyletischer Ursprung) oder mehrmals unabhängig (polyphyletischer Ursprung) im Laufe der Angiospermenevolution auftrat. Um diese Frage zu beantworten, wurde begonnen, die cDNA-Sequenzen der HSS und DHS von verschiedenen PA-haltigen Pflanzen zu identifizieren und phylogenetisch zu analysieren. Da zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit nur einige Sequenzdaten von *Senecio*-Arten und Tabak bekannt waren, wurden im Rahmen dieser Arbeit innerhalb der Familie der Boraginaceae die Arten *Cynoglossum officinale*, *Heliotropium indicum* und *Symphytum officinale* hinsichtlich ihrer HSS- und DHS-codierenden cDNA-Sequenzen untersucht. Erst durch die Analyse vieler verschiedener Vertreter PA-haltiger Pflanzen lässt sich die Frage nach dem Ursprung der PA-Biosynthese klären.

Zu Beginn dieser Arbeit standen mehrere degenerierte Primer zur Identifizierung von DHS und HSS zur Verfügung. Erste Primer wurden unter Nutzung hoch konservierter Regionen entworfen, die bei einem Vergleich von DHS- und HSS-Aminosäuresequenzen verschiedener Organismen aus Datenbanken identifiziert wurden (OBER und HARTMANN, 1999a, 1999b). Nachdem die DHS- und HSS-codierenden cDNA-Sequenzen von *Senecio vernalis* und die DHS-codierende cDNA aus *N. tabaccum* im Institut für Pharmazeutische Biologie kloniert worden waren, konnten die ersten degenerierten Primer weiter optimiert werden (OBER und HARTMANN, 1999a, 1999b). Diese verbesserten degenerierten Primer wurden nun zur Identifizierung der cDNA-Sequenzen der DHS und HSS aus verschiedenen Vertretern der Boraginaceae eingesetzt.

### 3.1 Boraginaceae

#### 3.1.1 *Cynoglossum officinale*

Tracerexperimente mit [ $^{14}\text{C}$ ]Putrescin an *C. officinale* Pflanzen von VAN DAM *et al.* (1995) hatten gezeigt, dass sowohl isolierte Wurzeln als auch isolierte Sprosse Pyrrolizidinalkaloide synthetisieren. Somit wurde aus beiden Geweben Gesamt-RNA isoliert, in cDNA durch reverse Transkription umgeschrieben und als Template in PCR-Reaktionen mit degenerierten Primern eingesetzt.

##### 3.1.1.1 Identifikation der cDNAs, die für die HSS und DHS aus *Cynoglossum officinale* codieren

###### 3.1.1.1.1 Ergebnisse der PCRs mit degenerierten Primern

Um die cDNA-Sequenz, die für das jeweilige DHS- und HSS-Protein codiert, zu identifizieren, wurden mehrere Kombinationen degenerierter Primerpaare eingesetzt. Bei den degenerierten Primern handelte es sich um ein Gemisch ähnlicher Primer, die an den variablen Positionen der Sequenz unterschiedliche Basen besaßen (2.5.5.1).

Aufgrund der Degeneriertheit der Primer ist theoretisch immer nur ein geringer Anteil der enthaltenden Primermoleküle in der Lage, an das vorhandene Template zu binden. Deshalb wurde die Primerkonzentration bis zu 2,5-fach gegenüber Standard-PCR-Bedingungen erhöht. Dies ist der Grund dafür, dass die Schmelztemperaturen der Primer so stark variierten (Tab. 3.1). Um dieses Problem zu kompensieren, wurde für die PCR-Amplifikationen ein modifiziertes „Touch Down“-Protokoll (DON *et al.*, 1991) verwendet. Dabei wurde die Annealingtemperatur gleichmäßig (0,5°C/Zyklus) von 60°C auf 45°C während der ersten 30 Zyklen gesenkt. Die nachfolgenden 10 Zyklen wurden bei konstanten 45°C durchgeführt.

**Tabelle 3.1** verwendete degenerierte Primer

		Oligonukleotidsequenz	Grad der Degeneriertheit	T <sub>m</sub> (°C)
<b><u>Forward Primer</u></b>				
I.	P5	5'-AAR ATH TTY YTN GGN TWY AC-3'	1536 x	49,8
II.	P9	5'-GAR GAR GAY YTN ATH AAR TGY YT-3'	1536 x	55,9
<b><u>Reverse Primer</u></b>				
I.	P3	5'-GCY TCR TCN GGW CKN GMR CC-3'	1024 x	61,0
II.	P8	5'-CCR TCR WAY TCY TGN GCN GTR TT-3'	1024 x	61,5

Folgender Code wurde verwendet:

H = A,T,C    K = T,G    M = A,C    N = A,T,C,G    R = A,G    S = C,G    W = A,T  
Y = T,C

Zuerst wurde eine PCR mit dem Primerpaar P5/P3 unter den oben angegebenen Bedingungen durchgeführt. Da diese PCR sowohl bei der cDNA aus dem Spross, als auch bei der cDNA aus der jungen Wurzel keine Amplifikate lieferte, wurden die jeweiligen PCR-Ansätze nach erfolgter PCR-Reaktion 1 : 100 mit sterilem Wasser verdünnt. Mit diesen Verdünnungen als Template (je 1 µL eingesetzt) wurde anschließend unter Verwendung des Primerpaares P9/P8 eine „nested PCR“ durchgeführt. Die dabei amplifizierten PCR-Produkte hatten eine Länge von etwa 550 bp und entsprachen damit der anhand eines Alignments bereits bekannter HSS- und DHS-Sequenzen erwarteten Längen. Diese Fragmente wurden in den pCR2.1 TOPO Vektor kloniert und in *E. coli* TOP10 Zellen transformiert. Die Plasmid-DNA wurde wie unter 2.5.1.3 beschrieben isoliert und sämtliche Klone zur Restriktionsanalyse mit *EcoRI* geschnitten. Die cDNA der Klone, die nach der Restriktionsanalyse ein Fragment der erwarteten Länge von etwa 550 bp aufwiesen, wurden sequenziert. Um zu ermitteln, ob es sich bei den erhaltenen Nukleotidsequenzen mit einer Länge von 545 bp tatsächlich um DHS- oder HSS-codierende cDNAs handelt, wurden diese mit den bekannten *Senecio vernalis* DHS- und HSS-Sequenzen (OBER und HARTMANN, 1999a, 1999b) mit dem GCG-Programm-Paket vergleichend analysiert. Die Sequenzvergleiche zwischen dem Fragment CoS-intern und den entsprechenden *Senecio vernalis* DHS- und HSS-Sequenzen ergaben auf Aminosäureebene eine Identität von 82,2 % bzw. 77,4 %. Beim Fragment CoW-intern lagen die Identitäten bei 76,1 % bzw. 77,4 %. Die Ähnlichkeiten der beiden internen Sequenzen zueinander lagen bei

76,2 % auf Nukleinsäureebene und bei 75,7 % auf Aminosäureebene. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei den aus der Sproß- und der Wurzel-cDNA amplifizierten Sequenzen um ein und dieselbe Sequenz handelte.

Aufgrund der Sequenzvergleiche wurde CoS-intern als CoS-DHS-intern (*Cynoglossum officinale*, cDNA aus dem Spross, DHS, **interne** Sequenz) und CoW-intern als CoW-HSS-intern (*Cynoglossum officinale*, cDNA aus der Wurzel, HSS, **interne** Sequenz) bezeichnet. Beide Fragmente enthielten je einen offenen Leserahmen von 181 Aminosäuren. Die eindeutige Zuordnung, ob es sich tatsächlich um eine DHS oder HSS handelt, konnte selbstverständlicherweise erst nach Identifizierung der gesamten offenen Leserahmen der cDNA-Sequenzen mit anschließender biochemischer Charakterisierung der rekombinanten Proteine erfolgen (3.3).

#### 3.1.1.1.2 5'- und 3'-RACE

Die jeweiligen Nukleotidsequenzen der erhaltenen internen Fragmente CoS-DHS-intern und CoW-HSS-intern ermöglichten nun das Design genspezifischer Primer (Tabellen 3.2 und 3.3), um nun die zu den internen Fragmenten noch fehlenden 5'- und 3'-Enden zu identifizieren. Für diese RACE-PCRs wurden folgende Primer entworfen.

**Tabelle 3.2**    **Verwendete genspezifische Primer für die 5'- und 3'-RACE der HSS aus *C. officinale***

	Oligonukleotidsequenz	T <sub>m</sub> (°C)
<b><u>Forward Primer</u></b>		
P49	5'-TTT GGA CAA GAT GTT AGA AGA GCA AAT ATC T-3'	61,6
<b><u>Reverse Primer</u></b>		
P50	5'-CCT CCT CTC AGG ATT A-3'	49,2
P51	5'-CAT TGA CTG ACT CAT CGT CCA TAG CAC ATA-3'	65,4

Die Lage der genspezifischen Primer ist in der Nukleotidsequenz der HSS-cDNA in Abb. 7.4 im Anhang dargestellt.

Die 3'RACE-PCR der HSS aus *C. officinale* wurde mit P49 als Forward Primer, dem Oligo-dT-Primer (2.5.6.2) als Reverse-Primer und cDNA (*C. officinale*, Wurzel) als Template (2.5.4) wie unter 2.5.6 beschrieben durchgeführt. Zur Amplifikation wurde ein „Touch

Down“-Programm mit einer abnehmenden Annealingtemperatur (0,5°C/Zyklus) von 70°C auf 60°C angewendet. Das erhaltene Amplifikat hatte eine Größe von 756 bp und wurde zur Sequenzierung in den pCR2.1 TOPO Vektor kloniert (2.4; 2.5.11.1). Die Sequenzanalyse ergab, dass das Amplifikat das 3'-RACE-Fragment der HSS darstellt. Die Analyse des 3'-RACE-Fragmentes identifizierte außerdem einen codierenden Bereich in einem offenen Leserahmen („open reading frame“ ORF) von 550 bp und einen 3'-nicht codierenden Bereich von 206 bp.

Für die Identifikation des 5'-Endes der HSS wurde die Gesamt-RNA aus der Wurzel von *C. officinale* zunächst mit dem Primer P50 reverse transkribiert und die so erhaltene spezifische einzelsträngige cDNA mit dCTP getailt. In der nachfolgenden PCR mit einem Zyklus bei 55°C und weiteren 33 Zyklen bei 60°C wurde diese cDNA als Template mit dem Primerpaar P51 und AAP eingesetzt. Das daraus erhaltene Amplifikat hatte eine Größe von 897 bp und wurde zur Sequenzierung in den pCR2.1 TOPO Vektor kloniert. Für das 5'-RACE-Fragment der HSS konnte nach Sequenzanalyse der Bereich des Primers P51 upstream bis zum Oligo-dC-tail identifiziert werden. Das 5'-RACE-Fragment beinhaltet einen ORF von 823 bp und 74 bp im 5'-nicht codierenden Bereich.

**Tabelle 3.3    Verwendete genspezifische Primer für die 5'- und 3'-RACE der DHS aus *C. officinale***

	Oligonukleotidsequenz	T <sub>m</sub> (°C)
<b><u>Forward Primer</u></b>		
P45	5'-AAA TGA TGG AGG AAC AAA ACA CGA AGA AAA TT-3'	61,8
<b><u>Reverse Primer</u></b>		
P46	5'-ACT GTT CAT TGA CCT AAT-3'	46,9
P47	5'-CAA CTA GAC CGA GGT CTT TGC GTA TAG AA-3'	65,3
P48	5'-CGT CAA ACC AGG GCA GTA GAC AGG TAT A-3'	66,6

Die Lage der genspezifischen Primer ist in der Nukleotidsequenz der DHS-cDNA in Abb. 7.5 im Anhang dargestellt.

Zur Amplifikation des 3'-Endes von CoW-DHS-intern wurde in einer „Touch Down“-PCR die Primer P45 (Tab. 3.3) und der bereits erwähnte Oligo-dT-Primer eingesetzt (2.5.6.2). Dabei wurde die Annealingtemperatur von 70°C auf 60°C (0,5°C/Zyklus) herabgesetzt. Das er-

haltene Amplifikat hatte eine Gesamtlänge von 760 bp, davon gehörten 548 bp zum offenen Leserahmen und 212 bp zum 3'-nicht codierenden Bereich.

Um das 5'-Ende des Fragmentes CoS-DHS-intern zu identifizieren, wurde zunächst die RNA (*C. officinale*, Spross) mit dem Primer P46 reverse transkribiert und anschließend die einzelsträngige spezifische cDNA unter Verwendung von dCTP getailt und wie unter 2.5.6.2 beschrieben weiter bearbeitet. Mit den Primern P47 und AAP sowie der getailten cDNA als Template, wurde die in einer „Touch Down“-PCR bei einer abnehmenden Annealingtemperatur (0,5°C/Zyklus) von 65°C auf 50°C ein spezifisches Fragment amplifiziert. Das 5'-Fragment wies eine Länge von 952 bp auf. Im ORF befanden sich 820 bp; der 5'- nicht codierende Bereich umfasste 132 bp.

Aufgrund der Sequenzidentität in den Überlappbereichen zwischen dem jeweiligen internen Fragment, der entsprechenden 3'-RACE und 5'-RACE konnte mit dem GCG-Softwarepaket eine hypothetische „full length“-cDNA (CoS-DHS-hypfl, CoW-HSS-hypfl) erstellt werden. Diese Sequenzen beinhalteten einen offenen Leserahmen, der ein HSS-Protein von 370 Aminosäuren (cDNA aus der Wurzel) bzw. ein DHS-Protein von 373 Aminosäuren (cDNA aus dem Spross) codiert.

#### **3.1.1.1.3 Proteinüberexpression**

Basierend auf den Sequenzdaten der hypothetischen „full length“ cDNA-Sequenzen (CoS-DHS-hypfl und CoW-HSS-hypfl), die aus dem Spross- und Wurzelgewebe von *C. officinale* identifiziert werden konnten, wurden genspezifische Expressionsprimer zur Amplifikation des jeweiligen gesamten ORFs entworfen.

Die Primer zur Amplifikation des „full length“ ORF der CoW-HSS-hypfl-cDNA wurden so entworfen, dass der Expressions-Forward-Primer P74 eine *NdeI* Restriktionsschnittstelle enthielt, die gleichzeitig das Start ATG codiert. Der Expressions-Reverse-Primer P75 enthielt eine *BamHI* Restriktionsschnittstelle direkt hinter dem Stopp-Codon TGA (Tab. 3.4).

Zur Amplifikation des ORF der DHS aus CoS-DHS-hypfl wurden diese Primer so entworfen, dass der Expressions-Forward-Primer P76 eine *XhoI*-Restriktionsschnittstelle gefolgt von einem Start-Codon (ATG) und der Expressions-Reverse-Primer P77 eine *BamHI*-Restriktionsschnittstelle direkt hinter dem Stopp-Codon (TGA) enthielt (Tab. 3.5).

**Tabelle 3.4** Verwendete Expressionsprimer zur Amplifikation der HSS-cDNA aus der Wurzel von *C. officinale*

	Oligonukleotidsequenz	T <sub>m</sub> (°C)
<b><u>Expressions Forward Primer</u></b>		
P74	5'-ATA TAC <u>ATA TGG</u> GAG AAG TAG CAA CCA GCA ACA A-3' <i>NdeI</i>	65,9
<b><u>Expressions Reverse Primer</u></b>		
P75	5'-ATT <u>GGA TCC</u> TCA CTT AGA TTT TTT ATC TGC AAT CTT C-3' <i>BamHI</i>	65,0

Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen, das Start-Codon im Forward-Primer sowie das Stopp-Codon im Reverse-Primer wurden fett hervorgehoben. Die Lage der genspezifischen Primer ist in der Nukleotidsequenz der HSS-cDNA in Abb. 7.4 im Anhang dargestellt.

Zur Amplifikation des ORF der HSS „full length“ cDNA aus Wurzel-cDNA von *C. officinale* wurde eine “full length” PCR mit *Pfx*-DNA-Polymerase (2.5.6.1.B), den Primern P74 und P75, und einer konstanten Annealingtemperatur von 60°C durchgeführt (Tab. 3.5). Das erhaltene Amplifikat von 1110 bp wurde gereinigt (2.5.1.5) und wie auch der hier verwendete pET3a-Vektor (2.4) mit den beiden Restriktionsenzymen *NdeI* und *BamHI* gemeinsam geschnitten und miteinander ligiert (2.5.11.2).

**Tabelle 3.5** Verwendete Expressionsprimer zur Amplifikation der DHS-cDNA aus dem Spross von *C. officinale*

	Oligonukleotidsequenz	T <sub>m</sub> (°C)
<b><u>Expressions Forward Primer</u></b>		
P76	5'-TAC <u>TCG AGA</u> TGG GGG AAG CCT TGA AAG AGC AA-3' <i>XhoI</i>	69,5
<b><u>Expressions Reverse Primer</u></b>		
P77	5'-ATT <u>GGA TCC</u> TCA CAA CTT GTT ATC TGC AGA TTT ACT-3' <i>BamHI</i>	66,1

Restriktionsschnittstellen wurden unterstrichen; das Start-Codon im Forward-Primer sowie das Stopp-Codon im Reverse-Primer wurden fett hervorgehoben. Die Lage der genspezifischen Primer ist in der Nukleotidsequenz der DHS-cDNA in Abb. 7.5 im Anhang dargestellt.



Die Primer P76 und P77 wurden zur Amplifikation des ORF der DHS „full length“ cDNA aus Spross-cDNA von *C. officinale* eingesetzt. Die PCR wurde mit *Pfx*-DNA-Polymerase (2.5.6.1.B) bei einer konstanten Annealingtemperatur von 60°C und 33 Zyklen durchgeführt. Das erwartete spezifische Amplifikat von 1119 bp wurde gereinigt, zuerst mit dem Restriktionsenzym *Xho*I und anschließend mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI geschnitten. In gleicher Weise wurde der Expressionsvektor pET3a-mod linearisiert und mit dem PCR-Fragment ligiert (2.5.11.2).

Die neu entstandenen Insert/Vektor-Konstrukte wurden in *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen transformiert (2.5.12.2). Die gewachsenen Klone wurden in einem PCR Kolonie Screening auf Fragmentgröße untersucht (2.5.13.2). Von den Klonen, die ein Amplifikat in der Größe des zuvor ligierten Inserts enthielten, wurden die Plasmid-DNAs isoliert (2.5.1.3), in die Bakterienzellen *E. coli* BL21 (DE3) transformiert (2.5.12.2) und die Expression der rekombinanten Proteine durch IPTG-Zugabe induziert (2.5.14). Eine erfolgreiche Expression des Proteins konnte anschließend durch Auftrennen der transformierten *E. coli* BL21 (DE3)-Extrakte in einer SDS-Gelelektrophorese festgestellt werden. Das Ergebnis war die sichtbare Expression eines Proteins von ungefähr 45 kDa.

#### **3.1.1.1.4 Klonierung und Expression von 6x His-markiertem Protein**

In einem am Institut für Pharmazeutische Biologie parallel bearbeiteten Projekt (NIEMÜLLER, 2006) sollte durch Immunolokalisation die Frage geklärt werden, wo bei verschiedenen Vertretern der Boraginaceen das HSS-Protein auf zellulärer Ebene exprimiert wird. Für diese Versuche sowie für vorbereitende Western-Blot-Analysen (2.8.2) war es zunächst notwendig, die HSS der jeweiligen Pflanze zu reinigen, um anschließend polyklonale Antikörper zu gewinnen. Innerhalb unserer Arbeitsgruppe wurden bereits erfolgreich zwei Reinigungsmethoden angewendet (ANKE, 2004). Einerseits wurde das zu untersuchende Protein konventionell (Reinigung der rekombinanten HSS aus *Phalaenopsis*), andererseits über einen sogenannten künstlich angefügten His-Tag gereinigt (Reinigung der rekombinanten HSS und DHS aus *E. cannabinum*). Beide Reinigungsmethoden lieferten das gewünschte Ergebnis. Aufgrund des wesentlich geringeren Zeitaufwandes wurde im Rahmen dieser Arbeit die His-Tag-Methode eingesetzt. Dafür wurden zunächst Expressionsprimer entworfen, um in der nachfolgenden PCR eine mit 6 Histidinresten markierte full length cDNA zu amplifizieren (Tab 3.6).

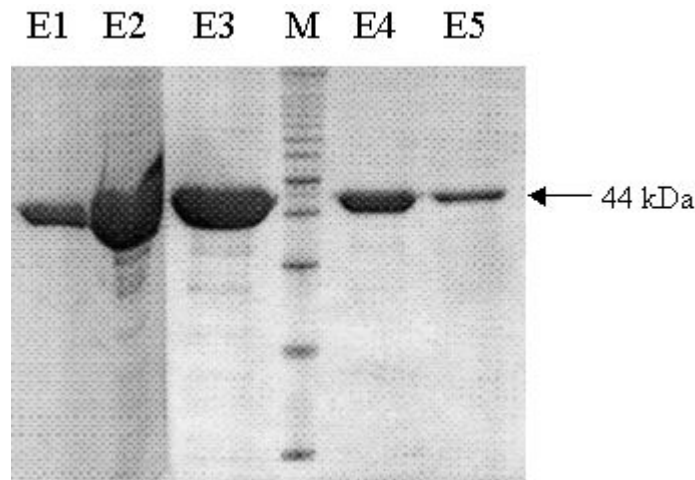
**Tabelle 3.6**    **Verwendete Expressionsprimer zur Amplifikation der „full length“-6xHis-Tag-cDNA aus der Wurzel von *C. officinale***

	Oligonukleotidsequenz	T <sub>m</sub> (°C)
<b><u>Expressions Forward Primer</u></b>		
P74	5'-ATA TAC <u>ATA TGG</u> GAG AAG TAG CAA CCA GCA ACA A-3' <i>NdeI</i>	65,9
<b><u>Expressions Reverse Primer 2</u></b>		
P50a	5'-ATT <u>GGA TCC</u> TCA ATG ATG ATG ATG ATG ATG CTT AGA <i>BamHI</i> *   *   *   *   *   *	70,9
	TTT TTT ATC TGC AAT CTT C-3'	

Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen; das Start-Codon im Forward-Primer sowie das Stopp-Codon im Reverse-Primer wurden fett hervorgehoben; die Triplets, die die 6 Histidine codieren, wurden mit einem \* markiert

Es wurde eine PCR mit *Pfx*-DNA-Polymerase wie unter 2.5.14.2 beschrieben bei einer konstanten Annealingtemperatur von 63°C durchgeführt. Das erhaltene Amplifikat wurde wie auch der verwendete pET3a-Vektor mit den beiden Restriktionsenzymen *NdeI* und *BamHI* geschnitten, und beide miteinander ligiert (2.5.11.2). Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten wie unter 3.1.1.1.3 beschrieben.

Zur Herstellung des spezifischen HSS-Antikörpers wurde zunächst die mit einem C-terminalem His-Tag versehene rekombinante HSS aus *C. officinale* über eine Ni-NTA-Agarose metallaffinitätschromatographisch in einem Schritt bis zur apparenten Homogität aufgereinigt (2.7.5), (Abb. 3.1) und anschließend wie unter 2.8.1 beschrieben für die Immunisierung vorbereitet.



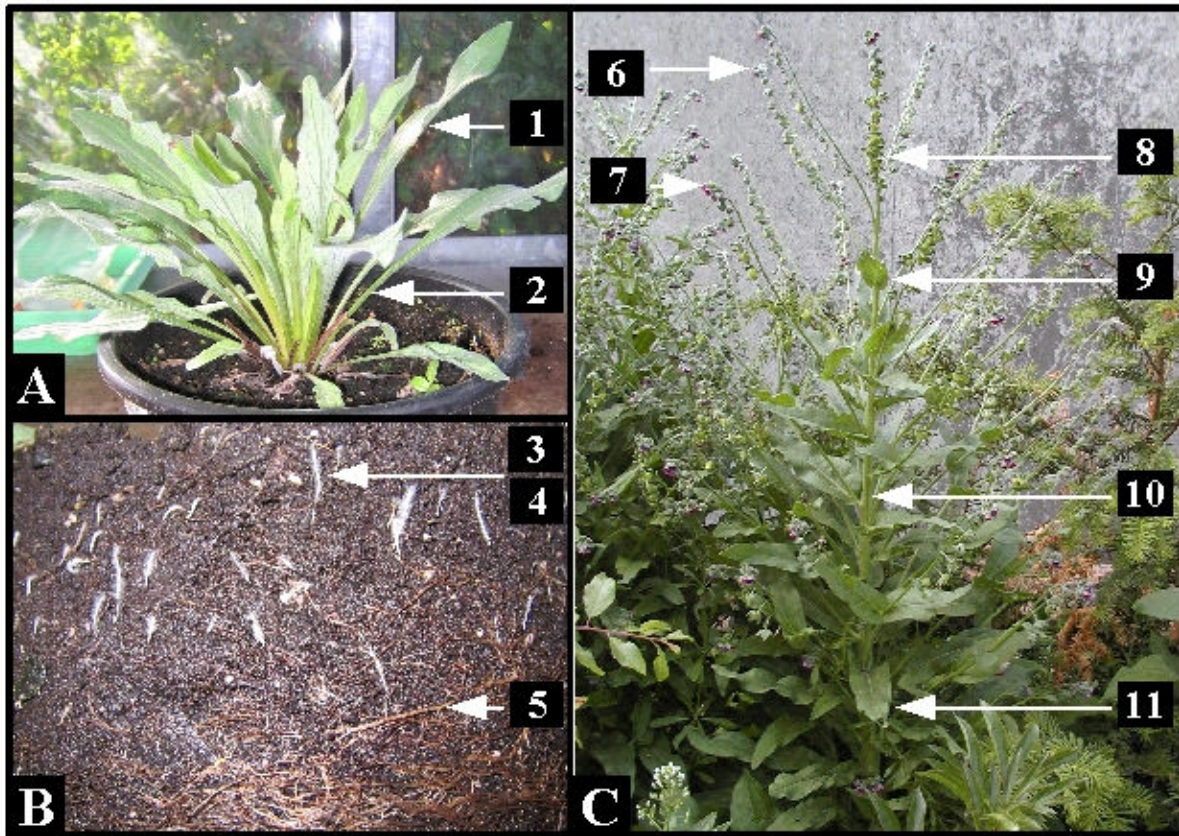
**Abb. 3.1 Metallchelataffinitätschromatografie der rekombinanten HSS aus *C. officinale*.** Jeweils 10 µl der Elutionsfraktionen (E1 bis E5) wurden auf einem 12 % SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt (M = 10 kDa Proteinleiter).

### 3.1.1.2 Transkriptionsanalyse der HSS und DHS in unterschiedlichen Geweben von *Cynoglossum officinale*

Mit der RT-PCR ist es möglich, selektiv unter Verwendung hochspezifischer Primer und geringer Menge an Ausgangsmaterial (Gesamt RNA) empfindliche, qualitative Nachweise von mRNA Molekülen durchzuführen. Dieser qualitative Nachweis ist sensitiver, als eine Northern-Blot Analyse, stellt jedoch quantitative Unterschiede in der Expressionsstärke nicht dar. Im Rahmen dieser Arbeit sollte mit der RT-PCR eine Transkriptionsanalyse der zu untersuchenden HSS mit ihrem phylogenetischen Vorfahr, der DHS, durchgeführt werden.

Für *C. officinale* Pflanzen konnte durch Tracerexperimente gezeigt werden, dass sowohl die Wurzeln, als auch der Spross PAs synthetisieren können (VAN DAM *et al.*, 1995). Um diese Ergebnisse auf molekularer Ebene zu bestätigen und um festzustellen, welche Gewebe genau für eine Expressionsanalyse auf Proteinebene und zur Immunolokalisation geeignet sind, wurden die Pflanzenorgane unterschiedlich alter Entwicklungsstadien in einzelne Gewebe unterteilt und einer Transkriptionsanalyse unterzogen.

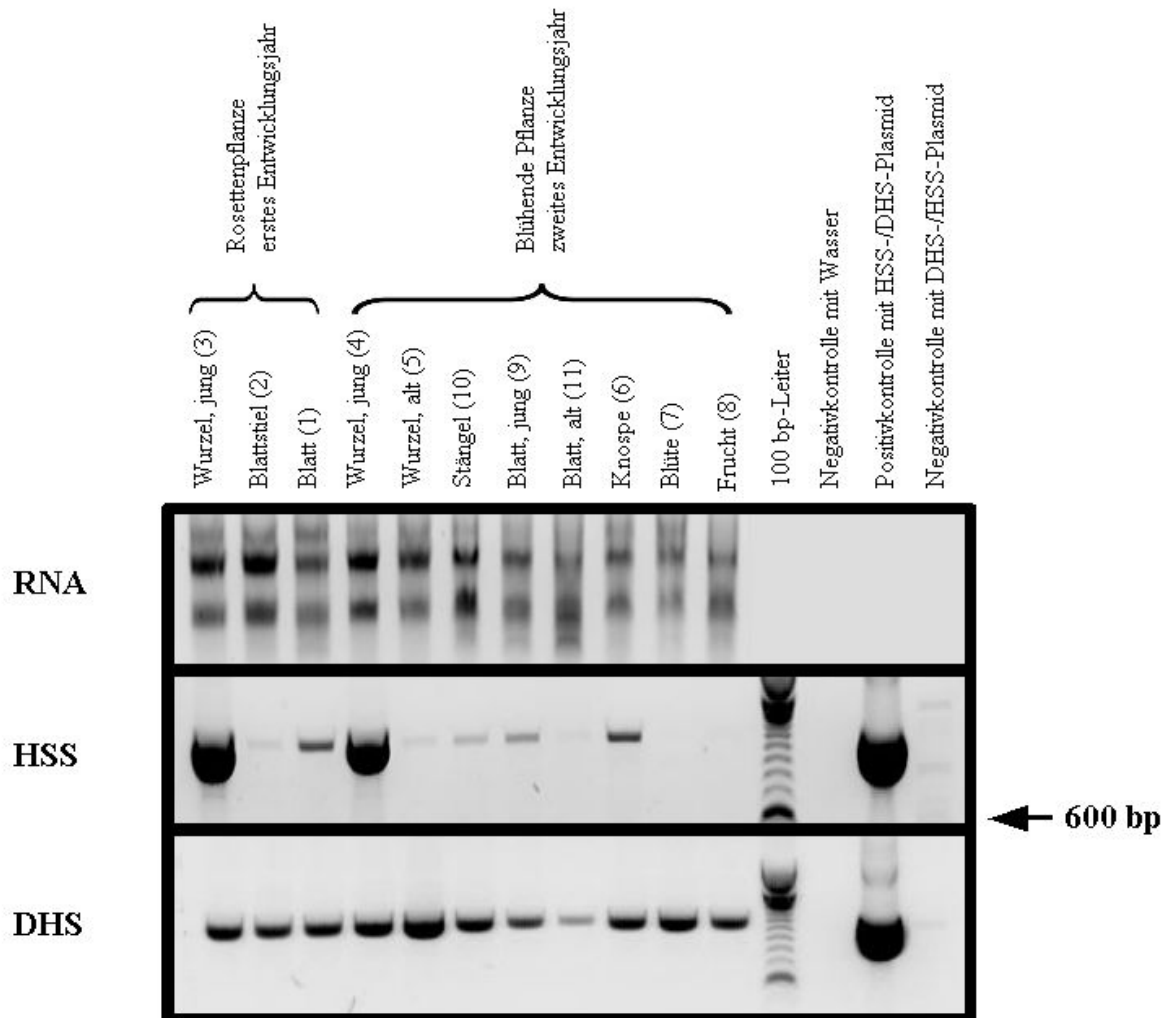
Da es sich bei *C. officinale* um eine zweijährige Pflanze handelt, wurde in dieser RT-PCR sowohl die nicht blühende Pflanze des Rosettenstadiums des ersten Jahres, als auch die blühende Pflanze des zweiten Entwicklungsjahres parallel untersucht.



**Abb. 3.2 Darstellung der für die RT-PCR verwendeten Pflanzenorgane von *C. officinale*.** A einjährige Rosettenpflanze; B Wurzelballen der Pflanze im zweiten Entwicklungsjahr; C Pflanze im zweiten Entwicklungsjahr 3 und 4, junge Wurzel (weiß); 2, Blattstiel; 1, Blatt; 5, alte Wurzel (braun); 10, Stängel; 9, junges Blatt; 11, altes Blatt; 6, Knospe; 7, Blüte; 8, Frucht).

Die Synthese der gewebespezifischen cDNAs erfolgte durch reverse Transkription (2.5.4) aus den jeweiligen Gesamt-RNAs (2.5.1.1) der Pflanzenorgane von *C. officinale*. Die so erhaltenen cDNAs wurden anschließend in einer PCR mit den entsprechenden genspezifischen Expressionsprimern für das *hss*-Gen bzw. das *dhs*-Gen amplifiziert (2.5.7).

Um falsch positive Amplifikate in der RT-PCR aufgrund von Kreuzreaktionen der genspezifischen Primer mit den jeweiligen cDNAs der HSS bzw. der DHS auszuschliessen wurden Positiv- und Negativansätze angesetzt. (Abb. 3.3). Für die Positivkontrolle zum Nachweis von HSS-Transkripten wurde als „template“ das HSS-Plasmid (3.1.1.1.3) eingesetzt; als Negativkontrolle wurde als „template“ das DHS-Plasmid (3.1.1.1.3) verwendet.



**Abb. 3.3** Quantitative Analyse der Gesamt-RNAs aus verschiedenen Organen von *C. officinale* und deren vergleichend durchgeführte RT-PCR der HSS und DHS aus *C. officinale*. In einem Agarosegel wurden zur Qualitäts- und Quantifizierungskontrolle pro Spur 1 µg der Gesamt RNAs aufgetrennt, von den PCR-Ansätzen wurden danach 4 µl PCR-Produkt eingesetzt. Zahlen 1-11 siehe Abb. 3.2.

Um etwa gleiche Mengen an RNA für die reverse Transkription einzusetzen, wurden zur Überprüfung der photometrischen Bestimmung des RNA-Gehaltes 1 µg jeder Gesamt-RNA-Präparation in einem Agarosegel aufgetrennt und verglichen (Abb. 3.3). Die annähernd gleichstark fluoreszierenden RNA Banden stellten sicher, dass bei der Reversen Transkription die gleichen gewebespezifischen RNA-Mengen (1 µg) in die jeweiligen cDNAs umgeschrieben wurden.

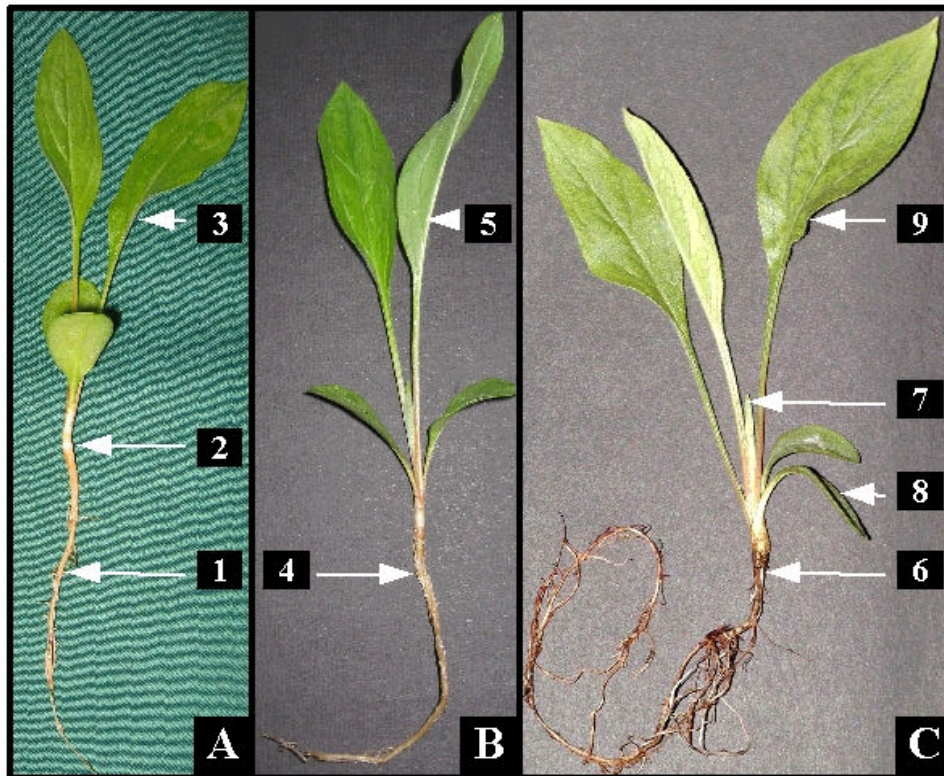
Alle PCR-Ansätze zum Nachweis möglicher HSS- und DHS-Transkripte wurden parallel in einem Thermocycler bei identischem Temperaturprogramm und unter Verwendung der jeweiligen organspezifischen cDNAs durchgeführt. Dadurch war es möglich eine vergleichende qualitative Aussage über die Transkription des *hss*- und *dhs*-Gens in *C. officinale* zu treffen. Eine quantitative Aussage wie viel mRNAs von HSS und DHS im jeweiligen Gewebe vorhanden waren, lässt sich mit dieser Methode nicht ermitteln.

Die Ergebnisse der RT-PCR in Abbildung 3.3 zeigen, dass die HSS bei der einjährigen Rosettenpflanze vor allem in den jungen weißen Wurzeln transkribiert wird. Eine deutlich schwächere Transkription des *hss*-Gens ist im jungen Blatt zu finden, fast gar nicht mehr erkennbar die sehr schwache Transkriptionsbande für die HSS im Blattstiel. Das *dhs*-Gen hingegen wird in allen untersuchten Geweben transkribiert.

Bei der Pflanze des zweiten Entwicklungsjahres sehen die Ergebnisse für die Transkription des *hss*-Gens ähnlich aus (Abb. 3.3). Auch hier wird die HSS, gekennzeichnet durch das deutliche Amplifikat, vor allem in den jungen Wurzeln transkribiert. Weitere schwache Transkriptionsbanden sind im Rhizom, im Stengel, im jungen Blatt und in der Knospe zu finden. Die DHS wird bei der Pflanze im zweiten Entwicklungsjahr wieder in allen Geweben und ähnlich stark wie in der einjährigen Rosettenpflanze transkribiert.

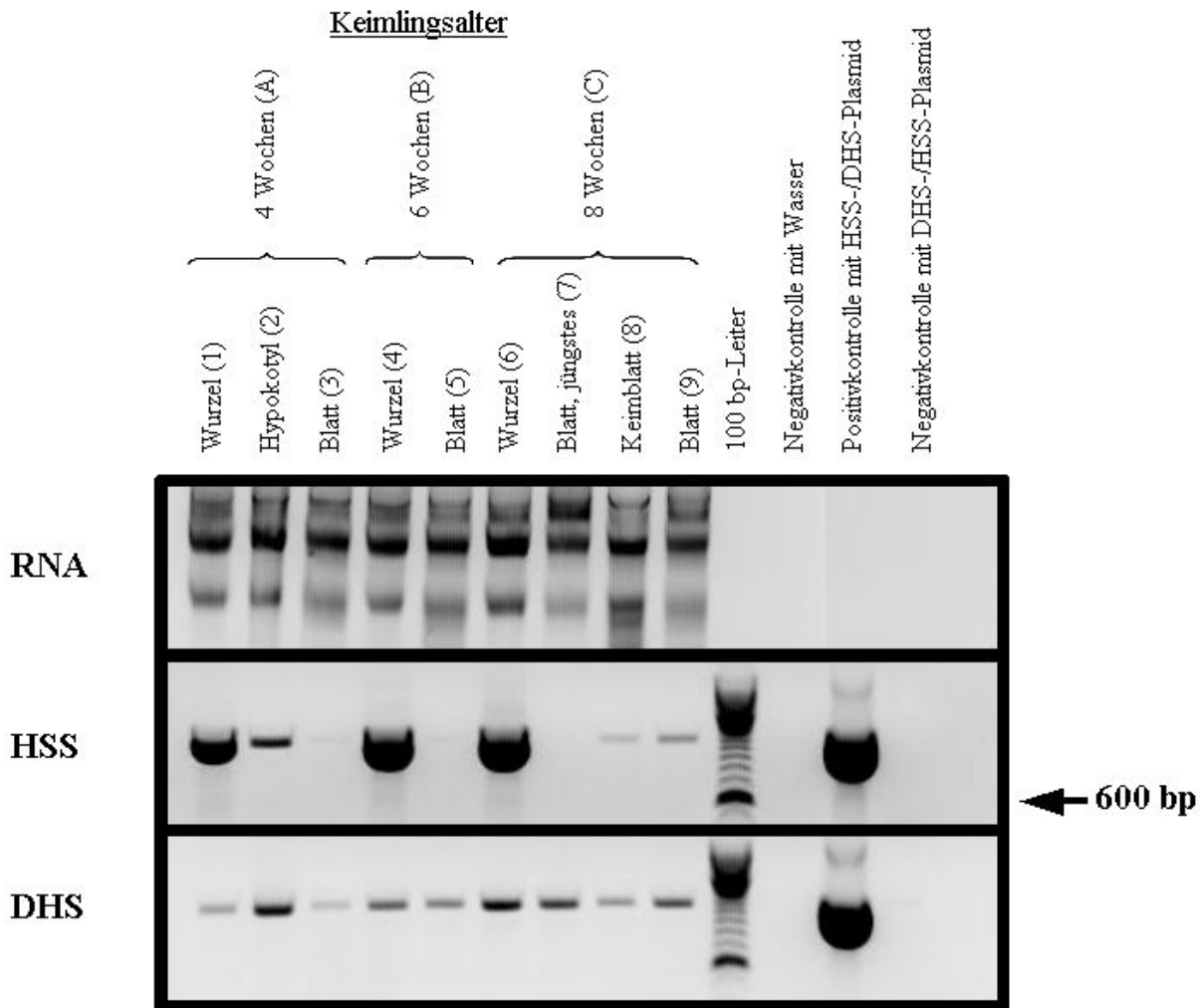
Die Transkriptionsanalyse der HSS aus *C. officinale* mit Hilfe der RT-PCR bestätigte die biochemischen Ergebnisse vorheriger Arbeiten (VAN DAM *et al.*, 1995). Dort konnte gezeigt werden dass die PA-Biosynthese sowohl in den Wurzeln als auch im Spross der Pflanze stattfindet. Überraschenderweise ist die HSS in diesen oberirdischen Organen von *C. officinale* nur sehr schwach transkribiert (Abb. 3.3). Da FRÖLICH (1996) Tracerexperimente an 29 Tage alten Keimlingen durchgeführt hat und zeigen konnte, dass diese in der Lage sind, PAs zu synthetisieren, stellte sich die Frage, ob die Transkription der HSS, wie ANKE *et al.* (2004) für die Wurzeln von *E. cannabinum* zeigen konnte vom Entwicklungsstadium der Pflanze abhängt. Deswegen wurden Pflanzen unterschiedlichen Alters (4, 6 und 8 Wochen alte Keimlinge) herangezogen und anschließend ebenfalls durch RT-PCR auf Transkription untersucht. Dazu wurden aus unterschiedlichen Pflanzenorganen (Wurzel, Hypokotyl, Blatt) die Gesamt-RNAs isoliert, in cDNAs revers transkribiert und anschließend wie oben bereits beschrieben in einer PCR auf Transkription des *hss*- und *dhs*-Gens untersucht (Abb. 3.4).





**Abb. 3.4** Darstellung der für die RT-PCR verwendeten Pflanzenorgane von *C. officinale* - Keimlingen. **A** 4 Wochen alt; **B** 6 Wochen alt; **C** 8 Wochen alt (1, Wurzel; 2, Hypokotyl; 3, Blatt; 4, Wurzel; 5, Blatt; 6, Wurzel; 7, jüngstes Blatt; 8, Keimblatt; 9, Blatt).

In Abbildung 3.5 lässt sich erkennen, dass bei allen untersuchten Pflanzen die HSS am stärksten in den Wurzeln transkribiert wird (Abb. 3.5). Weitere Transkriptionssignale sind bei den 4 Wochen alten *Cynoglossum*keimlingen im Hypokotyl und bei den 8 Wochen alten Keimlingen im Keimblatt und einem weiteren Blatt (Folgeblatt) zu finden. Die DHS war, wie bereits an der einjährigen Rosettenpflanze und der Pflanze im zweiten Entwicklungsjahr von *C. officinale* gezeigt wurde, in allen Pflanzengewebe deutlich, aber im Gegensatz zur HSS schwächer transkribiert.



**Abb. 3.5** Quantitative Analyse der Gesamt-RNAs aus verschiedenen Organen von *C. officinale* - Keimlingen und deren vergleichend durchgeführte RT-PCR der HSS und DHS aus *C. officinale*. In einem Agarosegel wurden zur Qualitäts- und Quantifizierungskontrolle pro Spur 1 µg der Gesamt RNAs aufgetrennt, von den PCR-Ansätzen wurden danach 4 µl PCR-Produkt eingesetzt. Zahlen 1-9 siehe Abb. 3.4.

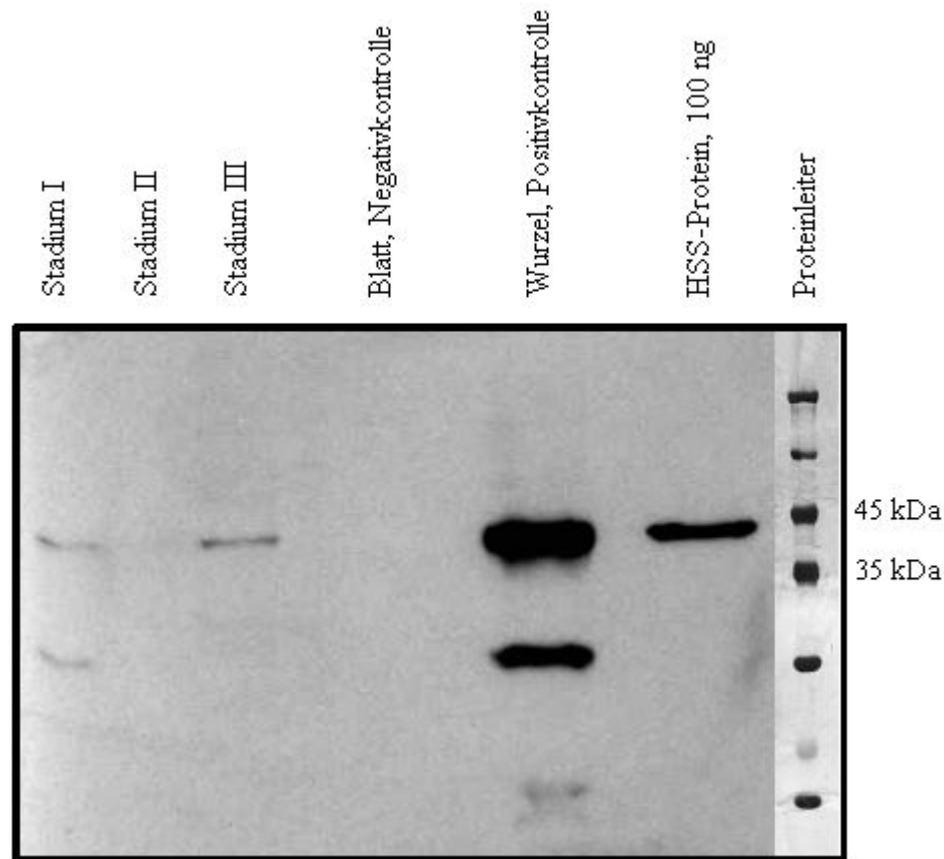
Neben den vorliegenden Ergebnissen zur Transkription des *hss*-Gens in *C. officinale* wurde anschließend die Expression der HSS auf Proteinebene mit Western-Blot untersucht, da eine geringe Transkriptmenge nicht zwangsläufig bedeutet, dass wenig Protein translatiert wird.

### 3.1.1.3 Western-Blot

Da die Transkription des *hss*-Gens in den unterschiedlichen oberirdischen Geweben der Pflanze nicht so intensiv war, wurden Untersuchungen auf Proteinebene mit Western-Blots durchgeführt. Bei den oberirdischen Geweben wurde nur das Gewebe mit der stärksten Transkription (Hypokotyl) weiter bearbeitet. Es stellte sich heraus, dass im verwendeten Hypokotylpräparat der Vegetationskegel der Blattrosette mit enthalten war. Dieser Vegetationskegel wurde nun bei den unterschiedlichen Pflanzenaltern genauer untersucht.



Für diesen Western-Blot wurden die jeweiligen Vegetationskegel der zwei, vier und sechs Wochen alten Keimlinge herauspräpariert und anschließend zur Gewinnung von Gesamtprotein (2.8.2) eingesetzt.



**Abb. 3.6 Western-Blot von Vegetationskegeln verschieden alter *C. officinale*-Keimlinge** (Stadium I, 2 Wochen alt; Stadium II, 4 Wochen alt; Stadium III, 6 Wochen alt). Expositionszeit des Blots auf Röntgenfilm 5 min.

Nur in Stadium I und Stadium III der untersuchten Vegetationskegel der Blattrosetten von *C. officinale* ist jeweils ein schwaches Signal für die Expression der HSS zu finden (Abb. 3.6). Die Negativkontrolle aus einem älteren Blatt zeigte kein Signal, was auf eine altersabhängige HSS-Expression hinweisen könnte (ANKE *et al.*, 2004).

Das Referenzprotein (HSS-Protein, 100 ng) und die Positivkontrolle aus der Wurzel zeigen eine starke Expression.

### 3.1.2 *Heliotropium indicum*

Als ein weiterer Vertreter der Pflanzenfamilie der Boraginaceae wurde *Heliotropium indicum* intensiver analysiert. *H. indicum* kommt natürlicherweise in Indien und Australien vor. Es handelt sich dabei um einen mehrjährigen Strauch, der in Europa eine Blütezeit von Mai bis September hat. Biochemische Tracerexperimente an abgeschnittenen Sprossen hatten gezeigt (FRÖLICH, 1996) dass *H. indicum*, im Gegensatz zu *C. officinale*, PAs ausschließlich in den oberirdischen Organen produziert. Dafür wurde zunächst Gesamt-RNA aus der Wurzel und dem Spross isoliert (2.5.1.1), in cDNA revers transkribiert (2.5.4) und anschließend wie bei *C. officinale* zur Identifikation der HSS- und DHS-codierenden cDNAs in PCRs als „templates“ eingesetzt.

#### 3.1.2.1 Identifikation der für die HSS und DHS aus *Heliotropium indicum* codierende cDNA

##### 3.1.2.1.1 PCR mit degenerierten Primern

Zur Identifikation der cDNA-Sequenzen, die für die jeweilige HSS und DHS codieren, wurde zunächst wie unter 2.5.6.1 beschrieben eine PCR mit degenerierten Primern durchgeführt. Verwendete degenerierte Primer sind in nachfolgender Tabelle zu finden:

**Tabelle 3.7 Verwendete degenerierte Primer**

	Oligonukleotidsequenz	Grad der Degeneriert-heit	T <sub>m</sub> (°C)
<b><u>Forward Primer</u></b>			
P9	5'-GAR GAR GAY YTN ATH AAR TGY YT-3'	1536 x	55,9
<b><u>Reverse Primer</u></b>			
P4	5'-CCC CAN SWN ACN GCY TCR TC-3'	1024	62,4

Verwendeter Code siehe Tab. 3.1

Es wurde eine „Touch Down“-PCR (2.5.6.1) mit dem Primerpaar P9/P4 durchgeführt (Tab. 3.7). Die Amplifikate erwarteter Größe wurden gereinigt und wie unter 2.5.11.1 beschrieben kloniert. Wie unter 3.1.1.1.1 beschrieben, wurde jeweils ein positiv gescreenter Klon (Template-cDNA Spross bzw. Template-cDNA Wurzel) bearbeitet und zur Sequenzie-

rung geschickt. Die isolierten Plasmide wurden bis etwa 350 bp ansequenziert. Sequenzvergleiche zwischen dem 306 bp langen Fragment HiS-intern (*H. indicum* Spross interne Sequenz) und den *Senecio vernalis* DHS- und HSS-Sequenzen (OBER und HARTMANN, 1999a, 1999b) ergaben auf Aminosäureebene eine Identität von 82,0 % bzw. 86,1 %. Beim ebenfalls 306 bp langen Fragment HiW-intern (*H. indicum* Wurzel interne Sequenz) lagen die Identitäten bei 84,0 % bzw. 76,2 %. Die Identitäten der beiden internen Sequenzen zueinander lagen bei 81,1 % auf Nukleinsäureebene und bei 81,2 % auf Aminosäureebene. Somit konnte aus der cDNA des Sprosses und der Wurzel von *H. indicum* zwei unterschiedliche, aber homologe Sequenzen identifiziert werden. Beide Fragmente enthielten einen ORF von 306 bp. Zum besseren Verständnis wird, wie schon für *C. officinale* unter 3.1.1.1.1 beschrieben, auch bei *H. indicum* bereits an dieser Stelle die Sequenzzuordnung vorgenommen, obwohl dies zeitlich gesehen erst nach den Ergebnissen der biochemischen Charakterisierung (3.3) stattfinden konnte. Somit wird die Sequenz HiS-intern als die interne Sequenz der HSS aus dem Spross von *H. indicum* (HiS-HSS-intern) bezeichnet. HiW-intern wird analog als die interne Sequenz der DHS aus der Wurzel von *H. indicum* bezeichnet.

### 3.1.2.1.2 5'- und 3'-Race

Die Nukleotidsequenzen der erhaltenen internen Fragmente HiS-HSS-intern und HiW-DHS-intern konnten nun zum Design genspezifischer Primer genutzt werden (Tabelle 3.8). Unter Nutzung dieser erhaltenen Sequenzdaten, konnten, wie bereits bei *Cynoglossum* beschrieben, mit genspezifischen Primern die noch fehlenden 5'- und 3'-Enden der HSS und DHS identifiziert werden.

**Tabelle 3.8** Verwendete genspezifische Primer für die 5'- und 3'-RACE der HSS aus *H. indicum*

Oligonukleotidsequenz		T <sub>m</sub> (°C)
<b><u>Forward Primer</u></b>		
P30	5'-ACA TGC TCT ACT TGC ATG CTA ACA ACA ATA-3'	62,7
<b><u>Reverse Primer</u></b>		
P31	5'-CAT TGC ATA TAT GAT GTT T-3'	45,9
P32	5'-CCC CAA GAA TTA TTA TTC CCG TCT TTC TT-3'	62,4
P33	5'-TCA TTG TCC ATG GCC CTC ACA TCT TCA-3'	65,0

Die Lage der genspezifischen Primer ist in der Nukleotidsequenz der HSS-cDNA in Abb. 7.6 im Anhang dargestellt.

Die Durchführung der RACE-PCRs erfolgte wie unter 2.5.6.2 beschrieben. Zur Amplifikation des 3'-Endes der HSS aus *H. indicum* wurden in einer „Touch Down“-PCR die Primer P30 und der Oligo-dT-Primer verwendet. Als Template wurde die cDNA aus dem Spross eingesetzt. Die Annealingtemperatur wurde dabei von 72°C auf 60°C (0,5°C/Zyklus) herabgesetzt. Um das 5'-Ende der HSS aus *H. indicum* zu amplifizieren wurde die Gesamt-RNA (1 µg) des Sprosses unter Verwendung von Primer P31 in cDNA umgeschrieben (2.5.6.2) und getailt. In der darauf folgenden PCR bei konstanten 60°C und 35 Zyklen kamen die Primer P32 und AAP (2.5.6.2) zum Einsatz, es konnten jedoch keine diskreten Banden der erwarteten Größe festgestellt werden. Also wurde der PCR-Ansatz 1:100 mit sterilem Wasser verdünnt und als Template in der anschließenden Nested-PCR eingesetzt. Als Primer wurden dabei P33 und der AUAP verwendet, das Temperaturprogramm war identisch zum Vorherigen.

**Tabelle 3.9    Verwendete genspezifische Primer für die 5'- und 3'-RACE der DHS-cDNA aus *H. indicum***

	Oligonukleotidsequenz	T <sub>m</sub> (°C)
<b><u>Forward Primer</u></b>		
P34	5'-CAT GTT ATA CAT ACA TGC TAT CCG CAA AGA-3'	62,7
<b><u>Reverse Primer</u></b>		
P35	5'-CCT GTG CTG TGT TAA TA-3'	47,9
P36	5'-TTG GGC AAC CCT CCC CCA AGA ACA ATA-3'	66,5
P37	5'-GTA CAG CCT CAC TGT TCA TGG CCC TAA T-3'	66,6

Die Lage der genspezifischen Primer ist in der Nukleotidsequenz der DHS-cDNA in Abb. 7.7 im Anhang dargestellt.

Die 3'-RACE-PCR der DHS aus *H. indicum* wurde mit dem Primer P34 und dem Oligo-dT-Primer bei einer konstanten Temperatur von 57°C und 33 Zyklen durchgeführt. Als Template wurde die cDNA aus der Wurzel verwendet. Für die Amplifikation des 5'-Endes der DHS wurde zunächst die Gesamt-RNA der Wurzel mit dem Primer P35 revers transkribiert und anschließend getailt. Die so erhaltene cDNA wurde in einer PCR mit dem Primerpaar P36 und AAP bei einer konstanten Temperatur von 60°C und 33 Zyklen eingesetzt. Da die erwartete Bande zu schwach ausgeprägt war wurde diese PCR 1:1000 verdünnt und als Template in einer Nested-PCR mit den Primern P37 und AUAP unter selbigen Bedingungen eingesetzt. Die komplette PCR wurde in einem 1,2 %igen TBE-Agarosegel (2.5.10) aufgetrennt, die er-

wartete Bande von etwa 900 bp scharf ausgeschnitten und anschließend mit dem QIAQUICK-Kit (2.5.1.4) aufgereinigt.

Alle so erhaltenen erwarteten RACE-PCR Amplifikate wurden wie unter 2.5.11.1 beschrieben kloniert und zur Sequenzierung (2.6) geschickt.

Über die Sequenzanalyse (2.10) konnte für die HSS aus dem Spross von *H. indicum* das gesuchte 5'-Ende von 877 bp und das gesuchte 3'-Ende von 678 bp identifiziert werden. Für die DHS aus der Wurzel von *H. indicum* wurden entsprechende Enden von 959 bp und 939 bp Länge ermittelt. Es konnten für das 3'-Fragment der HSS ein offener Leserahmen von 369 bp identifiziert werden. Für das 5'-Ende wurden in einem offenen Leserahmen 806 bp ermittelt. Das 3'-Fragment der DHS umfasste 373 bp im offenen Leserahmen und für das 5'-Ende konnten 832 bp im offenen Leserahmen ermittelt werden.

Durch das Zusammensetzen der jeweiligen Teilsequenzen konnten hypothetische, den jeweiligen offenen Leserahmen enthaltenden, full-length cDNAs für die HSS und DHS aus *H. indicum* postuliert werden. Diese könnten im Falle der HSS für ein Protein von 365 und im Falle der DHS für eines von 372 Aminosäuren codieren.

### 3.1.2.1.3 Proteinüberexpression

Auch hier wurden wie bereits unter 3.1.1.1.3 beschrieben, anhand der Sequenzdaten genspezifische Expressionsprimer zur Amplifikation des gesamten offenen Leserahmens der DHS und HSS aus *H. indicum* entworfen.

Für die Amplifikation der gesamten DHS-cDNA aus dem Spross von *H. indicum* wurde eine PCR (2.5.6.1.B) mit den Primern P82 und P83 bei einer konstanten Temperatur von 61°C und 35 Zyklen durchgeführt. Die Primer P80 und P81 wurden eingesetzt um die HSS-cDNA aus der Wurzel von *H. indicum* bei konstanten 60°C und ebenfalls 35 Zyklen zu amplifizieren (Tab. 3.10). Die erhaltenen Banden wurden wie unter 2.5.1.5 beschrieben gereinigt und die DNA der DHS genauso wie der zur Klonierung verwendete pET3a-Vektor zunächst mit *Xho*I und dann mit *Bam*HI geschnitten. Die DNA der HSS hingegen wurde wie auch der hier verwendete pET3a-mod-Vektor mit *Bam*HI und *Nde*I gemeinsam geschnitten. Vektoren und Inserts wurden ligiert (2.5.11.2) und mit einem Antibiotikum (2.5.12.2) gescreent. Aus den positiv getesteten Klonen (2.5.13.2) wurde die Plasmid-DNA isoliert (2.5.1.3) und wie unter 2.5.12.2 beschrieben in *E.coli* BL21 (DE 3) Zellen transformiert.

Die erfolgreiche Expression der rekombinanten Proteine durch IPTG-Zugabe (2.5.14) wurde durch Auftrennen der transformierten nicht induzierten und induzierten *E. coli* BL21 (DE3) in

einer SDS-Gelelektrophorese (2.7.3) kontrolliert. Die exprimierten denaturierten Proteine hatten eine Expressionsbande bei etwa 45 kDa.

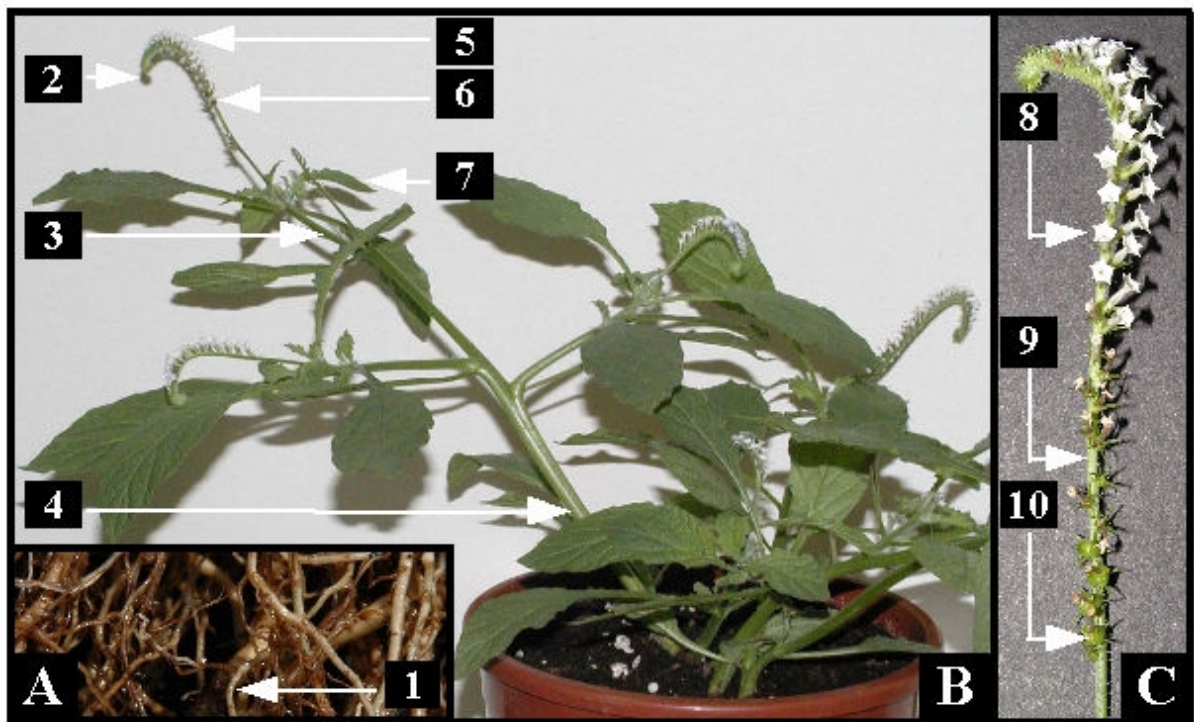
**Tabelle 3.10** Verwendete Expressionsprimer zur Amplifikation des gesamten offenen Leserahmens der DHS-cDNA und HSS-cDNA aus *H. indicum*

	Oligonukleotidsequenz	T <sub>m</sub> (°C)
<b><u>Expressions Forward Primer</u></b>		
P80	5'-ATA TAC <u>ATA TGG</u> GAG AGG TAG CCA CAA ATG CT-3' <i>NdeI</i>	65,6
P82	5'-TAC <u>TCG AGA</u> TGG GAG ATG TGA GTG AAG AGC AG-3' <i>XhoI</i>	69,5
<b><u>Expressions Reverse Primer</u></b>		
P81	5'-ATT <u>GGA TCC</u> TTA ACT TGA TTT CTT CAC CTT TGC AAA-3' <i>BamHI</i>	64,9
P83	5'-ATT <u>GGA TCC</u> CTA GCC AGA TTT ATT TAC TTT TGT GG-3' <i>BamHI</i>	66,0

Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen; das Start-Codon im Forward-Primer sowie das Stopp-Codon im Reverse-Primer wurden fett hervorgehoben. Die Lage der genspezifischen Primer ist in der Nukleotidsequenz der HSS- und DHS-cDNA in Abb. 7.6 und Abb. 7.7 im Anhang dargestellt.

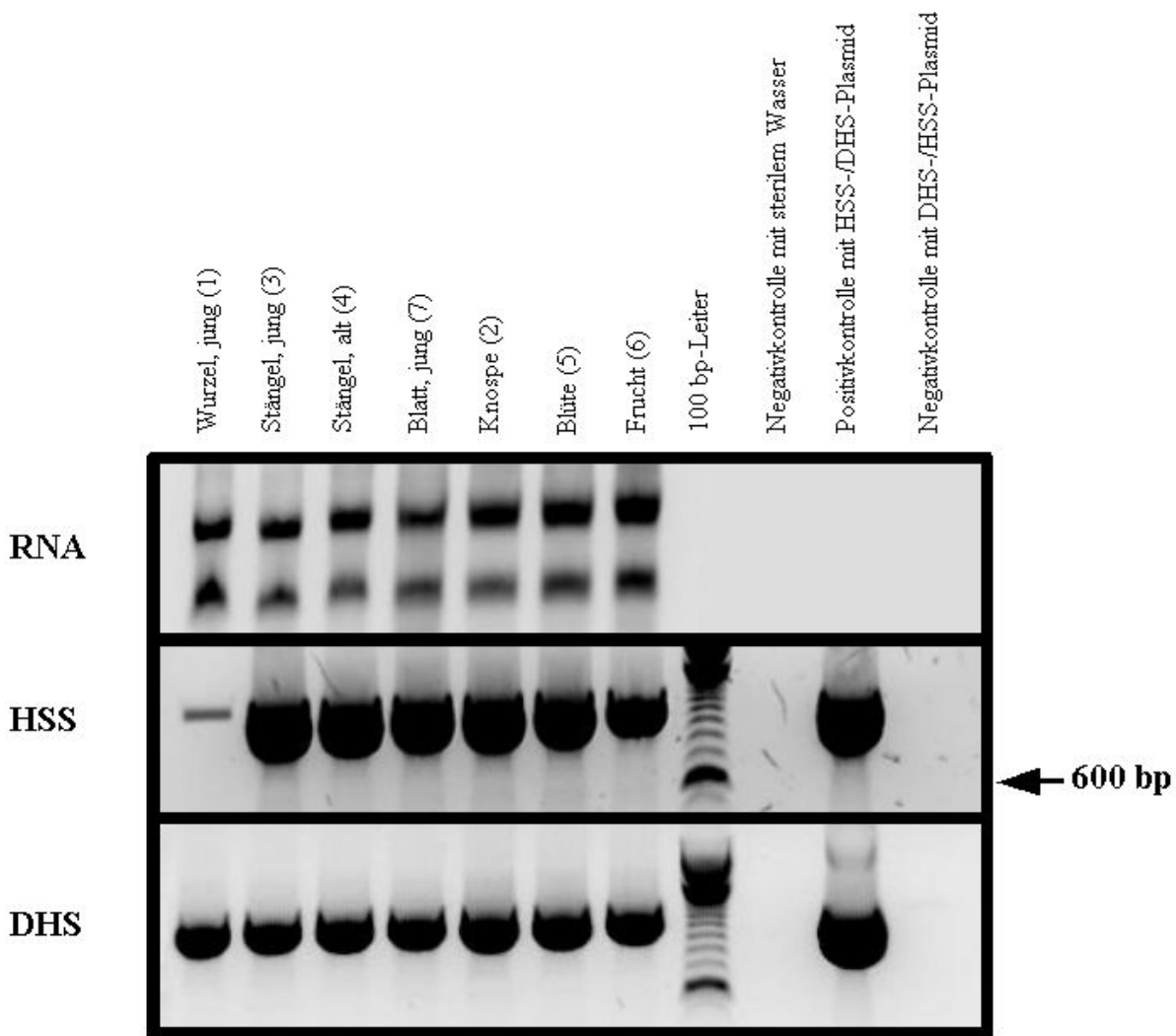
### 3.1.2.2 Transkriptionsanalyse der HSS und DHS in unterschiedlichen Pflanzengeweben von *Heliotropium indicum*

Auch *H. indicum* sollte zwecks einer späteren Expressionsanalyse auf Proteinebene und zur Einbettung geeigneter Gewebe für die Immunlokalisation auf Transkriptionsebene untersucht werden. Dazu wurden von Gewächshauspflanzen zum Zeitpunkt der Blüte die verschiedenen zu untersuchenden Gewebe geerntet (Abb. 3.7).



**Abb. 3.7** Die für die RT-PCR verwendeten Pflanzenorgane von *H. indicum*. A Wurzel; B gesamte Pflanze; C Blütenstand (1, junge Wurzel; 2, Knospe; 3, junger Stängel; 4, alter Stängel; 5, Blüte; 6, Frucht; 7, junges Blatt; 8, Blüten; 9, Stiel des Blütenstandes; 10, Frucht).

Die Gesamt-RNA wurde aus den einzelnen Geweben isoliert (2.5.1.1.1), der RNA-Gehalt photometrisch bestimmt (2.5.3) und nach vergleichender Analyse (3.1.1.2) je 1 µg Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben (2.5.4). Mit den jeweiligen Expressionsprimerpaaren P82/P83 für die DHS-cDNA und P80/P81 für die HSS-cDNA (Tab. 10) wurden die RT-PCRs (2.5.7; 2.5.6.1) angesetzt.



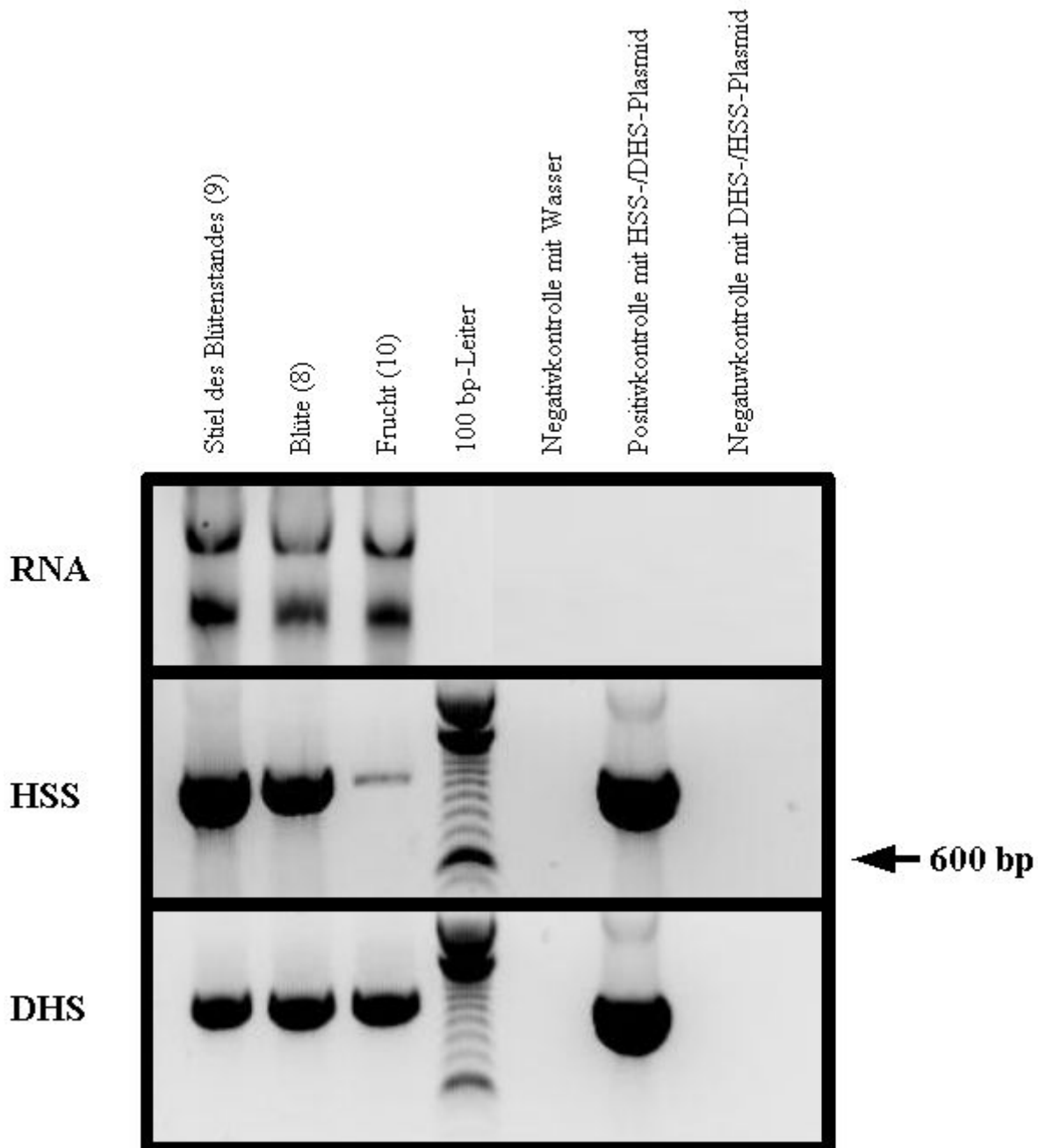
**Abb. 3.8 Quantitative Analyse der Gesamt-RNAs aus verschiedenen Organen von *H. indicum* und deren vergleichend durchgeführte RT-PCR der HSS und DHS (vgl. A und B in Abb. 3.7).** In einem Agarosegel wurden zur Qualitäts- und Quantifizierungskontrolle pro Spur 1 µg der Gesamt RNAs aufgetrennt; von den PCR-Ansätzen wurden danach 4 µl PCR-Produkt eingesetzt. Zahlen 1-7 siehe Abb. 3.7.

Abbildung 3.8 zeigt, dass die HSS in *H. indicum* bis auf das schwache Transkriptionssignal im Wurzelgewebe in allen untersuchten oberirdischen Geweben stark transkribiert wurde. Dadurch wurden die Ergebnisse von FRÖLICH (1996) bestätigt, die eine PA-Biosynthese durch Tracerexperimente ausschließlich in den oberirdischen Organen von *H. indicum* nachweisen konnte. Dabei konnte in den Wurzeln nur die Biosynthese von Homospermidin festgestellt werden. Somit muß auch in den Wurzeln von *H. indicum* die HSS transkribiert und exprimiert werden.

Die DHS wurde im Gegensatz zur HSS in allen untersuchten Pflanzengeweben (Abb. 3.8) gleichstark transkribiert. Diese Transkriptionsanalyse der DHS aus *H. indicum* bestätigte die Ergebnisse vergleichbarer Untersuchungen zur DHS aus *S. vernalis* und der nicht PA-produzierenden Pflanze *N. tabacum* (MOLL *et al.*, 2002).



Da *H. indicum* die für die Boraginaceae typischen Blütenstände, die sogenannten Wickel besitzt, wobei die jüngsten Blüten an der Spitze zu finden sind, sollte dieser Blütenstand zusätzlich untersucht werden. Bei der Transkriptionsanalyse der gesamten Pflanze (Abb. 3.8) wurden die untersuchten Organe nicht von der Blütenstandsachse getrennt, sondern der gesamte Blütenstand eingesetzt. Eine differenzierte Zuordnung der Amplifikationsbanden in der durchgeführten RT-PCR zu bestimmten Organen (Knospe, Blüte, Frucht, Blütenstandsachse) war nicht möglich. In einer weiteren Transkriptionsanalyse wurden nun die Blüten und Früchte getrennt vom darunterbefindlichen Stängel untersucht, indem dieser mit einem Skalpell von diesen Organen abgetrennt wurde (Abb.: 3.7 C). Die vorher notwendigen Arbeiten (RNA-Isolation, RNA Ladungskontrolle und Reverse Transkription) für die RT-PCR wurden wie bereits in diesem Kapitel beschrieben durchgeführt.



**Abb. 3.9** Quantitative Analyse der Gesamt-RNAs aus verschiedenen Organen des Blütenstandes von *H. indicum* und deren vergleichend durchgeführte RT-PCR der HSS und DHS (vgl. C in Abb. 3.7). In einem Agarosegel wurden zur Qualitäts- und Quantifizierungskontrolle pro Spur 1 µg der Gesamt RNAs aufgetrennt; von den PCR-Ansätzen wurden danach 4 µl PCR-Produkt eingesetzt. Zahlen 8-10 siehe Abb. 3.7.

Im Vergleich zur Transkriptionsanalyse der gesamten Pflanze von *H.indicum* konnten starke Signale für die HSS nur im Blütenstandsstängel und in der Blüte gefunden werden (Abb. 3.9). Isolierte Früchte wiesen dagegen nur eine sehr geringe Transkriptmenge auf.

Die Expressionsuntersuchungen zur DHS aus dem Blütenstand (Abb.: 3.9) von *H.indicum* waren identisch zu den vorherigen Untersuchungen an der gesamten Pflanze (Abb.: 3.8).

### 3.1.3 *Symphytum officinale*

*Symphytum officinale*, der Gemeine Beinwell, wurde als dritter Vertreter der Boraginaceae genauer analysiert. FRÖLICH (1996) konnte in transformierten Wurzelorgankulturen PA-Biosynthese nachweisen. Isolierte Kallus- und Sprosskulturen sind dagegen nicht zur PA-Biosynthese befähigt (HUIZING *et al*, 1983). Bei *S. officinale* handelt es sich, im Gegensatz zu den anderen beiden Vertretern der Boraginaceae, offenbar um einen Vertreter, der die PAs ausschließlich in den Wurzeln synthetisiert. Als Pflanzenmaterial wurde sowohl eine am Institut bereits etablierte Sterilkultur der gesamten Pflanze (2.2.3), als auch eine im Institutsgarten kultivierte Pflanze (2.2.3) genauer untersucht.

Die nachfolgenden Untersuchungen und Vorgehensweisen fanden analog zu den bereits weiter oben beschriebenen (3.1.1 und 3.1.2) statt.

#### 3.1.3.1 Identifikation der cDNA die für die HSS und DHS aus *Symphytum officinale* codiert

Zur Identifizierung der HSS und DHS wurde als Pflanzenmaterial ausschließlich die am Institut bereits etablierte Sterilkultur von *S. officinale* verwendet. Sowohl junge sterile Wurzeln, als auch junge sterile Sprossabschnitte wurden zur Isolation der Gesamt-RNA eingesetzt und wie bereits in Kap. 2.5.4 beschrieben zur Synthese der cDNA verwendet.

##### 3.1.3.1.1 Ergebnisse der PCRs mit degenerierten Primern

Zur Amplifikation eines internen Fragmentes aus der Wurzel von *S. officinale*, das später als Teil der HSS codierenden cDNA identifiziert wurde, kamen in der PCR ein „Touch Down“-Protokoll von 60°C auf 45°C und die Primer P9 und P4 (Tab. 3.11) zum Einsatz. In der Sequenzanalyse zeigte sich, dass das erhaltene Fragment Ähnlichkeiten zu HSS- und DHS-Sequenzen hatte und einen offenen Leserahmen von 590 bp aufwies.

**Tabelle 3.11** Verwendete degenerierte Primer

	Oligonukleotidsequenz	Grad der Degeneriert-heit	T <sub>m</sub> (°C)
<b><u>Forward Primer</u></b>			
P6	5'-TNG TNC CAN AYG AYA AYT AY-3'	1024x	52,2
P9	5'-GAR GAR GAY YTN ATH AAR TGY YT-3'	1536 x	55,9
<b><u>Reverse Primer</u></b>			
P3	5'-GCY TCR TCN GGW CKN GMR CC-3'	1024x	61,0
P4	5'-CCC CAN SWN ACN GCY TCR TC-3'	1024x	62,4
P8	5'-CCR TCR WAY TCY TGN GCN GTR TT-3'	1024x	61,5

Die Amplifikation eines internen Fragmentes mit degenerierten Primern aus dem Spross von *S. officinale*, das später als zur die DHS codierenden cDNA gehörig identifiziert wurde, gestaltete sich etwas schwieriger. Hier wurde zunächst mit dem Primerpaar P9 und P3 (Tab. 3.11) eine „Touch Down“-PCR von 60°C auf 45°C (0,5°C/Zyklus) durchgeführt. Da die erwartete Bande nicht deutlich genug ausgeprägt war um sie zu klonieren, wurde diese PCR 1:100 verdünnt und als „Template“ in einer weiteren „Touch Down“-PCR („Nested“-PCR) mit dem gegenüber dem Primerpaar P9 und P3 „weiter innen“ liegenden Primerpaar P6 und P8 eingesetzt (Tab. 3.11). Die Klonierung und Sequenzierung der PCR-Produkte wurde wie bereits mehrfach für *Cynoglossum* (3.1.1.1.1) beschrieben durchgeführt. Es konnte für die interne Sequenz der DHS ein offener Leserahmen von 442 bp, der Ähnlichkeiten zu bereits identifizierten HSS- und DHS-Sequenzen aufwies ermittelt werden.

### 3.1.3.1.2 5'- und 3'-Race

Anhand der Homologie der internen Sequenzen zu bereits bekannten HSS- und DHS-Sequenzen wurden wie auch bei den bereits im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Vertretern der Boraginaceae (*C. officinale*, *H. indicum*) die Primer für die jeweiligen 5'-und 3'-RACE entworfen (Tab. 3.12).

**Tabelle 3.12** Verwendete genspezifische Primer für die 5'- und 3'-RACE der HSS-cDNA aus *S. officinale*

	Oligonukleotidsequenz	T <sub>m</sub> (°C)
<b><u>Forward Primer</u></b>		
P41	5'-GAT GTT AGA AGA ACA AAT AAA CGA GAA AAA ACT-3'	50,6
<b><u>Reverse Primer</u></b>		
P42	5'-CAT CTT GTC CAA AAT GTT-3'	46,9
P43	5'-CCA GTC CTC AAA CTT ACA GTA ATT A-3'	58,1
P44	5'-AGC ATA GCT CCA GGT AAG GCA AAA T-3'	61,3

Die Lage der genspezifischen Primer ist in der Nukleotidsequenz der HSS-cDNA in Abb. 7.8 im Anhang dargestellt.

Das 3'-Ende der die HSS codierenden cDNA aus der Wurzel von *S. officinale* wurde mit den Primern P41 und dem Oligo-dT-Primer amplifiziert (Tab. 3.12). Es wurde ein „Touch Down“-Temperaturprogramm von 72°C auf 60°C (0,5°C/Zyklus) verwendet. Das 3'-Fragment der HSS hatte eine Gesamtlänge von 789 bp. Die Sequenzanalyse zeigte neben den Ähnlichkeiten zu bekannten HSS- und DHS-Sequenzen einen offenen Leserahmen von 544 bp.

Um das 5'-Ende der die HSS codierenden cDNA zu vervollständigen wurde zunächst mit dem Primer P42 die RNA aus der Wurzel von *S. officinale* in einer RT-Reaktion in cDNA umgeschrieben und getailt (2.5.6.2). Zunächst wurden in einer ersten PCR mit dem Primer AAP und Primer P43 zwei Zyklen bei konstant 50°C laufen gelassen und danach die PCR mit 32 Zyklen bei konstanten 60°C beendet. Da die erwartete Bande von etwa 600 bp nicht zu erkennen war, wurde eine nested PCR mit dem Primer P44 und dem AAP bei konstanten 60°C für 33 Zyklen durchgeführt. Das 5'-Ende der HSS wies dabei eine Gesamtlänge von 560 bp auf. Nach Sequenzanalyse konnte ein offener Leserahmen von 491 bp identifiziert werden.

Für die Amplifikation des 5'-Endes der DHS aus dem Spross von *S. officinale* wurde nach der reversen Transkription mit dem Primer P38 eine weitere PCR mit den Primern P39 und AAP bei konstant 60°C mit 33 Zyklen durchgeführt (Tab. 3.13). Da nach dieser PCR nur sehr schwache Banden zu erkennen waren, wurde dieser Ansatz nach der PCR-Reaktion 1:100 verdünnt und als template in einer „Nested“-PCR mit den Primern P40 und AUAP verwendet.

Die Gesamt-Länge des 5'-Endes der DHS umfasste 865 bp, nach Sequenzanalyse konnten davon 724 bp einem offenen Leserahmen zugeordnet werden.

Um das 3'-Ende der die DHS codierende cDNA aus dem Spross zu identifizieren wurde mit dem bereits entworfenem Expressionsforwardprimer P01 (Tab. 3.13) und dem Oligo-dT-Primer eine „Touch-Down“-PCR von 70°C auf 60°C durchgeführt. Für das 3'-Fragment der DHS wurden 1359 bp Gesamtlänge identifiziert, wovon nach der Sequenzanalyse 1119 bp einem offenen Leserahmen zugewiesen werden konnten.

Nach dem Zusammensetzen der Teilsequenzen wurden für die HSS und die DHS aus *Symphytum officinale* die noch fehlenden Expressionsprimer entworfen (Tab. 3.14).

**Tabelle 3.13** Verwendete genspezifische Primer für die 5'- und 3'-RACE der DHS aus *S. officinale*

	Oligonukleotidsequenz	T <sub>m</sub> (°C)
<b><u>Forward Primer</u></b>		
P01	5'-TAC TCG AGA TGG GTG AAG CCA TGA AAG AGC AG-3'	69,5
<b><u>Reverse Primer</u></b>		
P38	5'-TTC ATG GAC CTA ATA TCT-3'	46,9
P39	5'-TAG ACC AGG ATC TTT GCG TAT GGA ATG TAT-3'	64,0
P40	5'-AAC CAT CGG TCA AAC CAG GGC AGT AGA T-3'	66,6

Die Lage der genspezifischen Primer ist in der Nukleotidsequenz der DHS-cDNA in Abb. 7.9 im Anhang dargestellt.

### 3.1.3.1.3 Proteinüberexpression

Für die Amplifikation des gesamten offenen Leserahmens der HSS-cDNA wurde eine PCR mit den Primern P72 und P73 bei konstant 58°C und 33 Zyklen durchgeführt. Bei der Amplifikation des gesamten offenen Leserahmens der DHS-cDNA wurde bei konstant 57°C und 35 Zyklen die Primer P78 und P79 eingesetzt. Nach dem Reinigen der Amplifikate wurde die DNA der DHS und der hier verwendete pET3a-mod-Vektor mit *Xho*I und *Bam*HI gemeinsam geschnitten und anschließend wie unter 2.5.11.2 beschrieben ligiert und weiter bearbeitet. Die gereinigte DNA der HSS aus *S. officinale* wurde nacheinander mit *Xho*I und *Bcl*II geschnitten, der hier verwendete pET3a-mod-Vektor mit *Xho*I und *Bam*HI. Ligation und weitere Arbeit-

schritte erfolgten wie unter 2.5.11.2 und 2.5.14 beschrieben. Die exprimierten Proteine wurden im SDS-Gel bei etwa 45 kDa sichtbar.

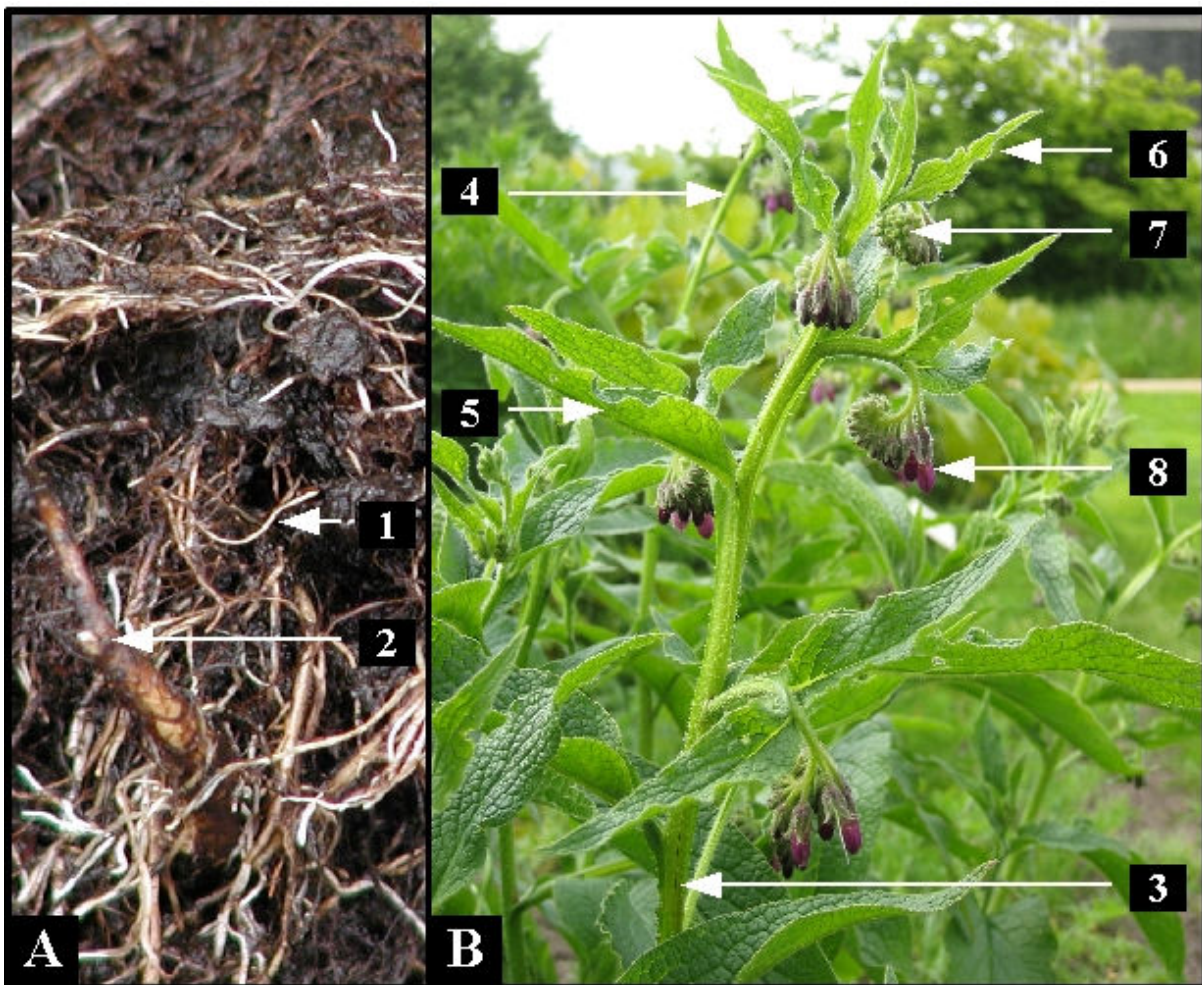
**Tabelle 3.14** Verwendete Expressionsprimer zur Amplifikation des gesamten offenen Leserahmens der DHS-cDNA und HSS-cDNA aus *S. officinale*

	Oligonukleotidsequenz	T <sub>m</sub> (°C)
<b><u>Expressions Forward Primer</u></b>		
P78	5'-TAC <u>TCG AGA</u> TGG GTG AAG CCA TGA AAG AGC AG-3' <i>XhoI</i>	69,5
P72	5'-TAC <u>TCG AGA</u> TGG GGG AAG TAG CCG CTG CT-3' <i>XhoI</i>	70,9
<b><u>Expressions Reverse Primer</u></b>		
P79	5'-ATT <u>GGA TCC</u> TCA CAA CTT GTT TTC TGC AGA TTT AGT-3' <i>BamHI</i>	66,1
P73	5'-TAT <u>GAT CAT</u> CAC TTA GAT AAA TTA TTT GCC TGT TT-3' <i>BclII</i>	61,3

Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen; das Start-Codon im Forward-Primer sowie das Stopp-Codon im Reverse-Primer wurden fett hervorgehoben. Die Lage der genspezifischen Primer ist in der Nukleotidsequenz der HSS- und DHS-cDNA in Abb. 7.8 und Abb. 7.9 im Anhang dargestellt.

### 3.1.3.2 Transkriptionsanalyse der HSS und DHS in unterschiedlichen Pflanzengeweben von *Symphytum officinale*

Auch *S. officinale* sollte für spätere Untersuchungen auf Proteinebene und mit Immunolokalisationstechniken zunächst auf das Vorhandensein von HSS und DHS auf Transkriptionsebene (3.1.1.2) untersucht werden. Zur Transkriptionsanalyse wurden die entsprechenden Gewebe der Pflanze aus dem Arzneipflanzengarten zum Zeitpunkt des Blühens eingesetzt (Abb. 3.10).



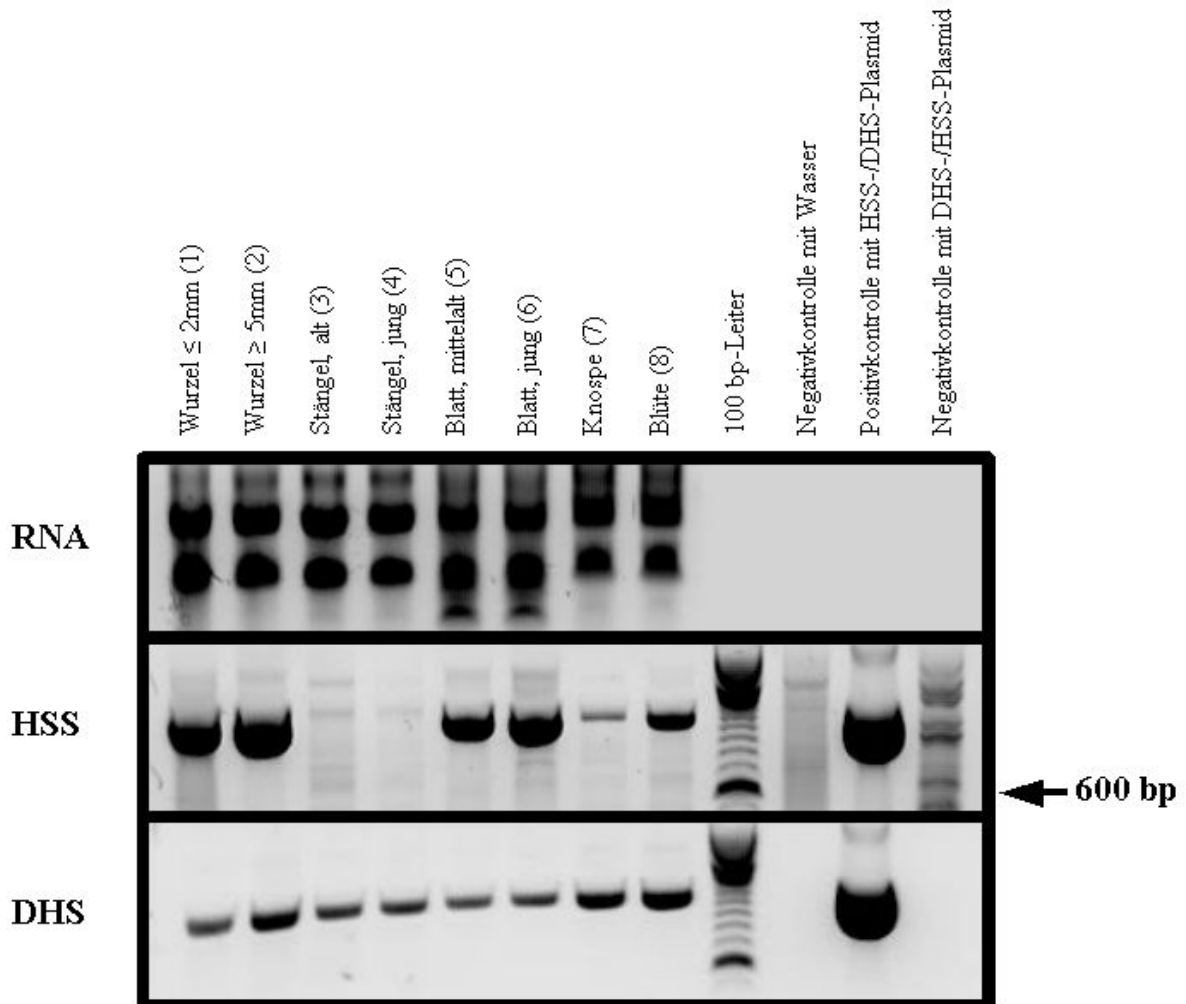
**Abb. 3.10:** Darstellung der für die RT-PCR verwendeten Pflanzenorgane von *S. officinale* aus dem Arzneipflanzengarten. **A** Wurzel; **B** oberirdische Pflanzenteile ; (1, Wurzel, Breite  $\leq 2$  mm; 2, Wurzel, Breite  $\geq 5$  mm; 3, alter Stängel; 4, junger Stängel; 5, mittelaltes Blatt; 6, junges Blatt; 7, Knospe; 8, Blüte).

Die Isolation der jeweiligen RNAs, die Reverse Transkription und die Durchführung der PCR erfolgte analog den bereits für *Cynoglossum* beschriebenen Transkriptionsanalysen (3.1.1.2).

Wie bereits auch bei den anderen Boraginaceae festgestellt werden konnte, wird die DHS in *Symphytum officinale* ebenfalls in allen untersuchten Pflanzengeweben transkribiert (Abb. 3.11). Die HSS hingegen wurde in den Wurzeln transkribiert, was die biochemischen Ergeb-



nisse von FRÖLICH (1996) an transformierten Wurzelorgankulturen dieser Pflanze bestätigte. Erstaunlich waren weitere stark positive Transkriptionssignale für die HSS in den jungen und mittelalten Blättern, da bisher keine Daten über das Vorhandensein einer HSS in oberirdischen Pflanzenteilen bekannt waren. Deutlich schwächere Signale konnten für die HSS in den Knospen und Blüten detektiert werden.



**Abb. 3.11: Quantitative Analyse der Gesamt-RNAs aus verschiedenen Organen des Blütenstandes von *S. officinale* und deren vergleichend durchgeführte RT-PCR der HSS und DHS (vgl A und B in Abb. 3.10).** In einem Agarosegel wurden zur Qualitäts- und Quantifizierungskontrolle pro Spur 1  $\mu\text{g}$  der Gesamt RNAs aufgetrennt, von den PCR-Ansätzen wurden danach 4  $\mu\text{l}$  PCR-Produkt eingesetzt. Zahlen 1-8 siehe Abb. 3.10.

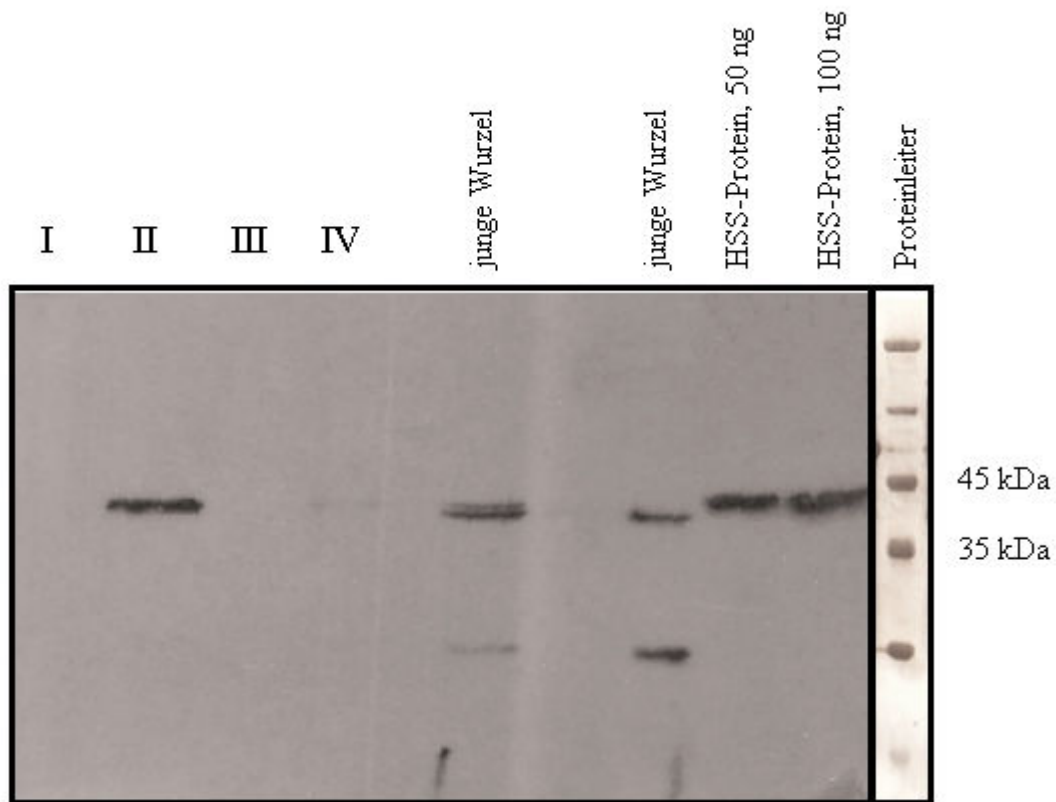
Bisherige Untersuchungen an Kalluskulturen von *S. officinale* hatten gezeigt, dass in diesen bis dato keine PAs detektiert werden konnten (HUIZING *et al.*, 1983). Auch war bisher nicht bekannt das *S. officinale* in oberirdischen Pflanzenorganen PAs synthetisieren kann. Aufgrund der hier gezeigten Ergebnisse besitzt *S. officinale* auch in den Blättern die für das HSS-Protein codierende mRNA für eine mögliche PA-Biosynthese. Um die HSS nun auch auf Proteinebene in den oberirdischen Geweben nachzuweisen wurden Westernblotanalysen durchgeführt.

### 3.1.3.3 Western-Blot

Weil die positiven Signale in den Blättern von *S. officinale* in der RT-PCR eine HSS-Expression in den oberirdischen Organen nahe legen, diese aber nach FRÖLICH'S Untersuchungen (1996) keine PA-Biosynthese aufweisen, sollte mit Western-Blot abgeklärt werden, ob in den Blättern nicht nur eine HSS-Transkription auf RNA-Ebene, sondern auch auf Proteinebene erfolgt. Dazu wurden junge und mittelalte Blätter zum Zeitpunkt des beginnenden Blühens der Pflanze geerntet und zur Proteinextraktion eingesetzt. Durch Arbeiten von D. Niemüller stand ein spezifischer affinitätsgereinigter Antikörper gegen die HSS aus *S. officinale* zur Untersuchung der HSS-Expression im Gewebe zur Verfügung. Der Western-Blot wurde wie unter 2.8.2 beschrieben durchgeführt.

Auf Expressionsebene lassen sich Signale im jungen endständigen Blatt eines Seitentriebes der nur Knospen besaß (Spur II) detektieren (Abb. 3.12). Auch in einer älteren Bearbeitung dieser Probe (Spur IV) konnte das HSS-Protein im Blattgewebe nachgewiesen werden, wobei das Signal in Spur IV deutlich schwächer als in Spur II ausfällt (Abb. 3.12). Gleichalte Blätter eines Triebes, der jedoch voll erblühte Blüten trägt (Spur I), ergaben wie die endständigen Blätter von blütenlosen Trieben (Spur III), kein Signal. In einem zuvor von NIEMÜLLER (2007) durchgeführten Western-Blot mit allen Pflanzengeweben von *S. officinale* konnte bereits gezeigt werden, dass die übrigen jungen und mittelalten Blätter keine HSS-Proteinexpression zeigen. Gesamtproteinextrakte aus der Wurzel und rekombinantes HSS-Protein von *S. officinale* lieferten, wie zu erwarten war, starke Signale.

Die im Western-Blot auftretenden Doppelbanden in den jungen Wurzeln von *S. officinale* konnten auch von NIEMÜLLER (2007) in Western-Blot-Untersuchungen an Wurzeln von *C. officinale* festgestellt werden. In den daraufhin von NIEMÜLLER durchgeführten Untersuchungen an *S. jacobaea* konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Banden um Abbauprodukte des HSS-Proteins handelt, die vermutlich aus der Kontaminierung mit Proteinasen aus der den Wurzeln anhaftenden Erde resultieren.



**Abb. 3.12 Western-Blot junger Blätter von *S. officinale*.** (I, junges endständiges Blatt eines Seitentriebes mit Blüten; II, junges endständiges Blatt eines Seitentriebes der nur Knospen besaß; III, junges endständiges Blatt eines Seitentriebes ohne Blütenanlage; IV, älteres Blatt von II; es wurden je 20 µg Protein aufgetragen).

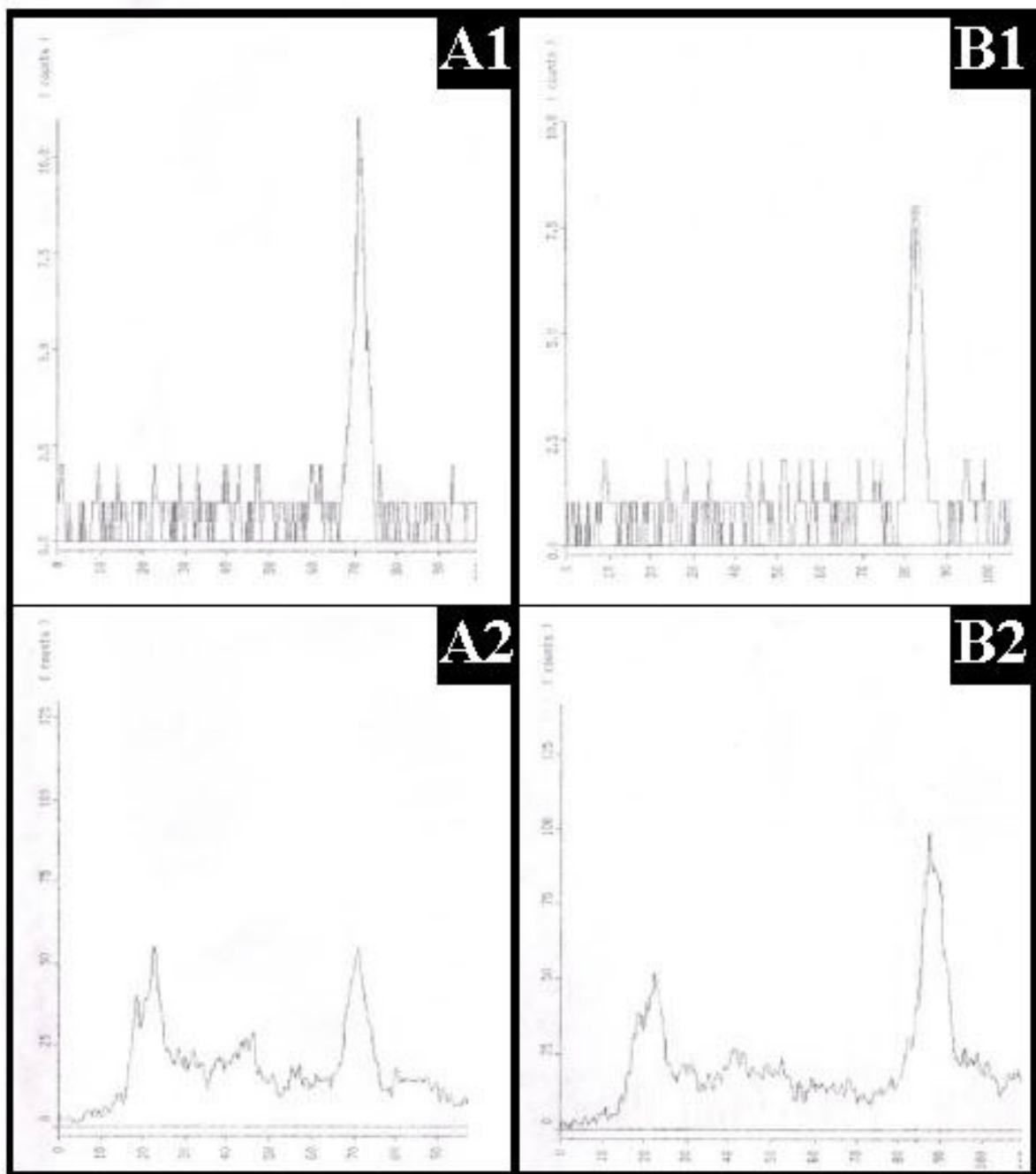
Das Ergebnis des Western-Blots zeigt, dass die HSS nur in jungen endständigen Blättern von Seitentrieben mit Knospen bzw. Blütenanlagen exprimiert wird. Ob in diesen Geweben weiterhin die gesamte PA-Biosynthese stattfindet, lässt sich darüber hinaus nicht sagen.

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, konnte in den Wurzeln von *H. indicum* die Transkription der HSS nachgewiesen werden. FRÖLICH (1996) konnte in den Wurzeln von *H. indicum* nur die Synthese von Homospermidin nachweisen, jedoch keine PA-Biosynthese. Das bedeutet, dass der Nachweis einer HSS-Transkription keinen Beweis für die PA-Biosynthese liefert.

#### 3.1.3.4 Tracerversuche an Blättern von *Symphytum officinale*

Um weitere Hinweise auf eine mögliche PA-Biosynthese in den Blättern von *S. officinale* zu bekommen wurden junge, mittelalte und alte Blätter wie unter Kap. 2.9 beschrieben mit [ $^{14}\text{C}$ ]Putrescin radioaktiv gefüttert. Die in den Wurzeln dieser Pflanze vorkommenden Alkaloide des Lycopsamintyps liegen in Form ihrer *N*-Oxide vor (FRÖLICH, 1996). Retronecin, eine Necinbase und der Grundkörper der meisten PAs vom Lycopsamintyp sollte durch diese Untersuchungen nachgewiesen werden. Lässt sich Retronecin in den untersuchten Blättern von *S. officinale* nachweisen, wäre dies ein deutlicher Hinweis auf eine PA-Biosynthese.

Nach Fütterung mit radioaktivem [ $^{14}\text{C}$ ]Putrescin wurden die Blätter extrahiert und die in den Rohextrakten enthaltenen Alkaloide reduziert. Die so aus den *N*-Oxiden entstehenden unpolaren tertiären Alkaloide wurden anschließend hydrolysiert. Bei der Hydrolyse der PAs kommt es zur Spaltung in die Grundkörper Necinsäure und Necinbase. Eine radioaktive Markierung kann nur bei der Necinbase auftreten. Diesen ersten spezifischen Schritt in der Synthese des Necinbasen-Grundkörpers katalysiert die HSS (2.9.1; Abb. 2.2.). Zur Identifizierung von radioaktivmarkiertem Retronecin wurde neben den jeweiligen hydrolysierten Proben auch ein Retronecinstandard auf die DC aufgetragen. Durch einen Vergleich der Lage des jeweiligen Retronecinstandardpeaks (A1, B1) mit den Peaks der jeweiligen hydrolysierten Proben der jungen Blätter (A2) und der mittelalten Blätter (B2) auf den entsprechenden DC-Platten konnte eine Zuordnung von Retronecin stattfinden (Abb. 3.13). Um zu Beweisen, dass es sich in den Pflanzenproben bei dem Peak tatsächlich um Retronecin handelt, müssten weitere Untersuchungen wie z.B. Gaschromatographie-Massenspektroskopie (GC-MS) durchgeführt werden.



**Abb. 3.13 Rapid Intelligence TLC Analyser (RITA)-Chromatogramme.** (A1, [ $^3\text{H}$ ]Retronecinstandard; A2, junge Blätter nach Aufarbeitung; B1, [ $^3\text{H}$ ]Retronecinstandard; B2, mittelalte Blätter nach Aufarbeitung)

In den jungen und mittelalten (mittelgroßen) Blättern von *S. officinale* sind also neben den Nachweisen von HSS-Transkripten durch RT-PCR und eines HSS-Proteins durch Western-Blot auch radiobiochemisch deutliche Hinweise auf eine PA-Biosynthese in diesen oberirdischen Organen gegeben.

## 3.2 Asteraceae

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte genauere Untersuchung einiger PA-produzierender Vertreter der Boraginaceae (*C. officinale*, *H. indicum* und *S. officinale*) hat gezeigt, dass die HSS innerhalb dieser Pflanzenfamilie sowohl in ober- als auch in unterirdischen Organen und Geweben transkribiert wird. Nur zwei Triben der Asteraceae, die Senecioneae und die Eupatorieae besitzen Vertreter, die PAs enthalten. Die bisherigen Daten dieser intensiv untersuchten Familie hatten gezeigt, dass innerhalb der Senecioneae und Eupatorieae die HSS ausschließlich im Wurzelgewebe lokalisiert ist (MOLL *et al.*, 2002; ANKE *et al.*, 2004). Mit *Petasites hybridus* sollte nun ein bislang nicht untersuchter weiterer Vertreter der Senecioneae, der nicht so nahe mit den bisher untersuchten Pflanzen der Gattung *Senecio* verwandt ist, analysiert werden. Damit sollte überprüft werden, ob innerhalb der Asteraceae die HSS ausschließlich in den Wurzel lokalisiert ist oder wie bei den bisher untersuchten Boraginaceae, auch in den oberirdischen Organen und Geweben nachzuweisen ist.

### 3.2.1 *Petasites hybridus* (Senecioneae)

*Petasites hybridus* stand am Institut als Sterilkultur zur Verfügung. Biochemische Untersuchungen zum PA-Biosyntheseort innerhalb der Pflanze existieren zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen nicht. Die Durchführung der nachfolgenden Versuche erfolgte analog den Beschreibungen in Kap 3.1.1.

#### 3.2.1.1 Identifikation der cDNA die für die HSS und DHS aus *Petasites hybridus* codiert

##### 3.2.1.1.1 PCR mit degenerierten Primern

Sowohl für die Amplifikation der internen HSS-cDNA aus der Wurzel und der internen DHS-cDNA aus dem Spross von *P. hybridus* wurden die degenerierten Primer P5 und P4 (Tab. 3.15) in einer „Touch Down“-PCR von 60°C auf 45°C verwendet (2.5.6.1).

**Tabelle 3.15** verwendete degenerierte Primer

	Oligonukleotidsequenz	Grad der Degeneriertheit	T <sub>m</sub> (°C)
<b><u>Forward Primer</u></b>			
P5	5'-AAR ATH TTY YTN GGN TWY AC-3'	1536 x	49,8
<b><u>Reverse Primer</u></b>			
P4	5'-CCC CAN SWN ACN GCY TCR TC-3'	1024	62,4

Nach der Sequenzanalyse der erhaltenen internen Amplifikate von etwa 698 bp konnten genspezifische Primer für die noch fehlenden 3'- und 5'-Enden der cDNAs entworfen werden (Tab. 3.16).

#### 3.2.1.1.2 5' und 3' Race

Das 3'-Ende der HSS-cDNA wurde mit dem Primern P52 und dem Oligo-dt-Primer (2.5.4) in einer PCR bei konstanten 55°C mit 33 Zyklen erzeugt. Für das 3'-Ende der HSS konnte nach Sequenzanalyse eine Gesamtlänge von 782 bp (642 bp im offenen Leserrahmen) ermittelt werden. Bei der Amplifikation des 5'-Endes der HSS-cDNA wurden nach der Reversen Transkription mit dem Primer P53 in einer PCR bei 60°C mit 33 Zyklen die Primer P54 und der AAP eingesetzt (3.1.3.1.2). Da im Agarosegel nur Schmier und keine Banden zu erkennen waren, wurde der Ansatz nach erfolgter PCR 1:100 verdünnt und in der danach folgenden nested PCR als template eingesetzt. Als Primer wurden der P55 und der AUAP bei dem gleichen Temperaturprogramm (3.1.3.1.2) verwendet. Äquivalent wurde für das 5'-Ende der HSS nach Sequenzanalyse eine Gesamtlänge von 688 bp gefunden (669 bp im offenen Leserahmen).

**Tabelle 3.16** Verwendete genspezifische Primer für die 5'- und 3'-RACE der HSS aus *P. hybridus*

	Oligonukleotidsequenz	T <sub>m</sub> (°C)
<b><u>Forward Primer</u></b>		
P52	5'-TTG CGA TCT AAA GGA TTA AAT CGC ATC-3'	60,4
<b><u>Reverse Primer</u></b>		
P53	5'-ACA GCC TCA TTA TCC AT-3'	47,9
P54	5'-GAC AAC CAG ACC AGG ATT GGT AAC T-3'	63,0
P55	5'-TGC CCA ATA TAG ATA TGA AGA CTC GTT-3'	60,4

Die Lage der genspezifischen Primer ist in der Nukleotidsequenz der HSS-cDNA in Abb. 7.10 im Anhang dargestellt.

In einer „Touch Down“-PCR von 70°C auf 60°C mit 20 bzw. 15 Zyklen (2.5.6.1) und mit den Primern P56 und Oligo-dt-Primer (2.5.4) wurde das 3'-Ende der DHS-cDNA amplifiziert (Tab. 3.17). Nach der Sequenzanalyse konnte für das 3'-Fragment der DHS eine Gesamtlänge von 707 bp (395 bp davon in einem offenen Leserahmen) ermittelt werden. Für die Amplifikation des 5'-Endes der DHS-cDNA wurde in der RT-Reaktion der Primer P57 eingesetzt. Da in einer ersten PCR mit den Primern P58 und AAP bei konstanten 55°C mit 33 Zyklen nur sehr schwache Banden zu erkennen waren, wurde auch hier nach Verdünnen des Ansatzes der ersten PCR (1:100) eine nested PCR mit den Primern P59 und AUAP bei konstanten 60°C mit 33 Zyklen durchgeführt.



**Tabelle 3.17** Verwendete genspezifische Primer für die 5'- und 3'-RACE der DHS aus *P. hybridus*

	Oligonukleotidsequenz	T <sub>m</sub> (°C)
<b><u>Forward Primer</u></b>		
P56	5'-CTT GCG TTC AAA AGG ACT AAA TCG TAT T-3'	60,7
<b><u>Reverse Primer</u></b>		
P57	5'-TGG AGC GTA TAA TAT ACT -3'	46,9
P58	5'-GCA GTG TTA ATG AAA ACA GCG TAA TCA-3'	60,4
P59	5'-CTA AAA TGA TTA TCC CGG TCT TCC TA-3'	60,1

Die Lage der genspezifischen Primer ist in der Nukleotidsequenz der DHS-cDNA in Abb. 7.11 im Anhang dargestellt.

Das 5'-Ende der DHS umfasste nach erfolgter Sequenzanalyse 1011 bp, davon 856 bp in einem offenen Leserahmen.

Nach dem Erstellen der hypothetischen full length-cDNAs für die HSS und DHS aus *P. hybridus* konnten Expressionsprimer entworfen werden (Tab. 3.18), um damit die heterologe Proteinexpression in *E. coli* zu ermöglichen.

### 3.2.1.1.3 Proteinüberexpression

Mit dem Primerpaar P86/P87 und der cDNA aus dem Spross von *P. hybridus* wurde die PCR mit *Pfx*-DNA-Polymerase bei konstanten 65°C mit 33 Zyklen zur Amplifikation der full length DHS-cDNA durchgeführt (Tab. 3.18). Gereinigtes Amplifikat und der verwendete pET3a-mod-Vektor wurden anschließend mit den Restriktionsenzymen *Xho*I und *Bam*HI geschnitten und wie bereits für *Cynoglossum* (3.1.1.1.3) beschrieben kloniert und zur Expression gebracht.

**Tabelle 3.18** Verwendete Expressionsprimer zur Amplifikation des gesamten offenen Leserahmens der DHS-cDNA (PhS-B) und HSS-cDNA (PhW-A) aus *P. hybridus*

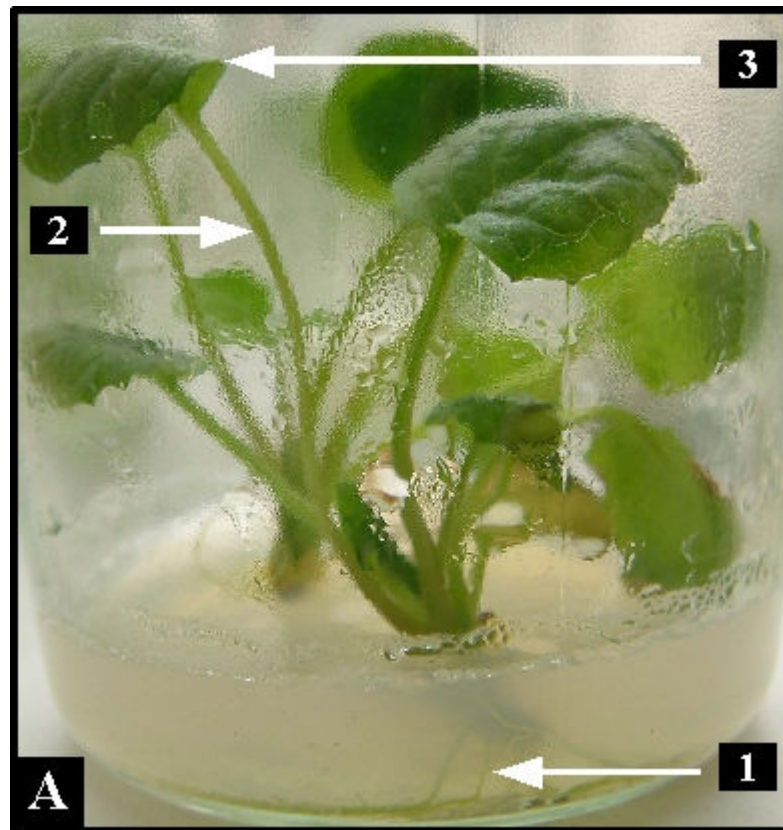
	Oligonukleotidsequenz	T <sub>m</sub> (°C)
<b><u>Expressions Forward Primer</u></b>		
P86	5'-TAC <u>TCG AGA</u> TGG GGG AAT CTT TGA AAC AAG CG-3' <i>XhoI</i>	68,2
P84	5'-ATA TAC <u>ATA TGG</u> GGT CTA ACA AAC AAG CAG AGA-3' <i>NdeI</i>	64,5
<b><u>Expressions Reverse Primer</u></b>		
P87	5'-ATT <u>GGA TCC</u> TTA TTT CTC TCG CTT TGC AGC AAA TG-3' <i>BamHI</i>	67,1
P85	5'-ATT <u>GGA TCC</u> TTA AAA GCC ATT GAC TTT AGA TGC TTT-3' <i>BamHI</i>	64,9

Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen; das Start-Codon im Forward-Primer sowie das Stopp-Codon im Reverse-Primer wurden fett hervorgehoben. Die Lage der genspezifischen Primer ist in der Nukleotidsequenz der HSS- und DHS-cDNA in Abb. 7.10 und Abb. 7.11 im Anhang dargestellt.

Die full length HSS-cDNA wurde aus der Wurzel von *P. hybridus* mit dem Primerpaar P86/87 ebenfalls mit *Pfx*-DNA-Polymerase bei konstanten 60°C mit 33 Zyklen amplifiziert (Tab. 3.18). Das erhaltene Amplifikat und der verwendete pET3a-Vektor wurden mit *NdeI* und *BamHI* geschnitten. Die erfolgreiche Expression der durch die klonierten cDNAs codierenden Proteine konnte im SDS-Agarosegel durch sichtbare Banden bei etwa 45 kDa beobachtet werden.

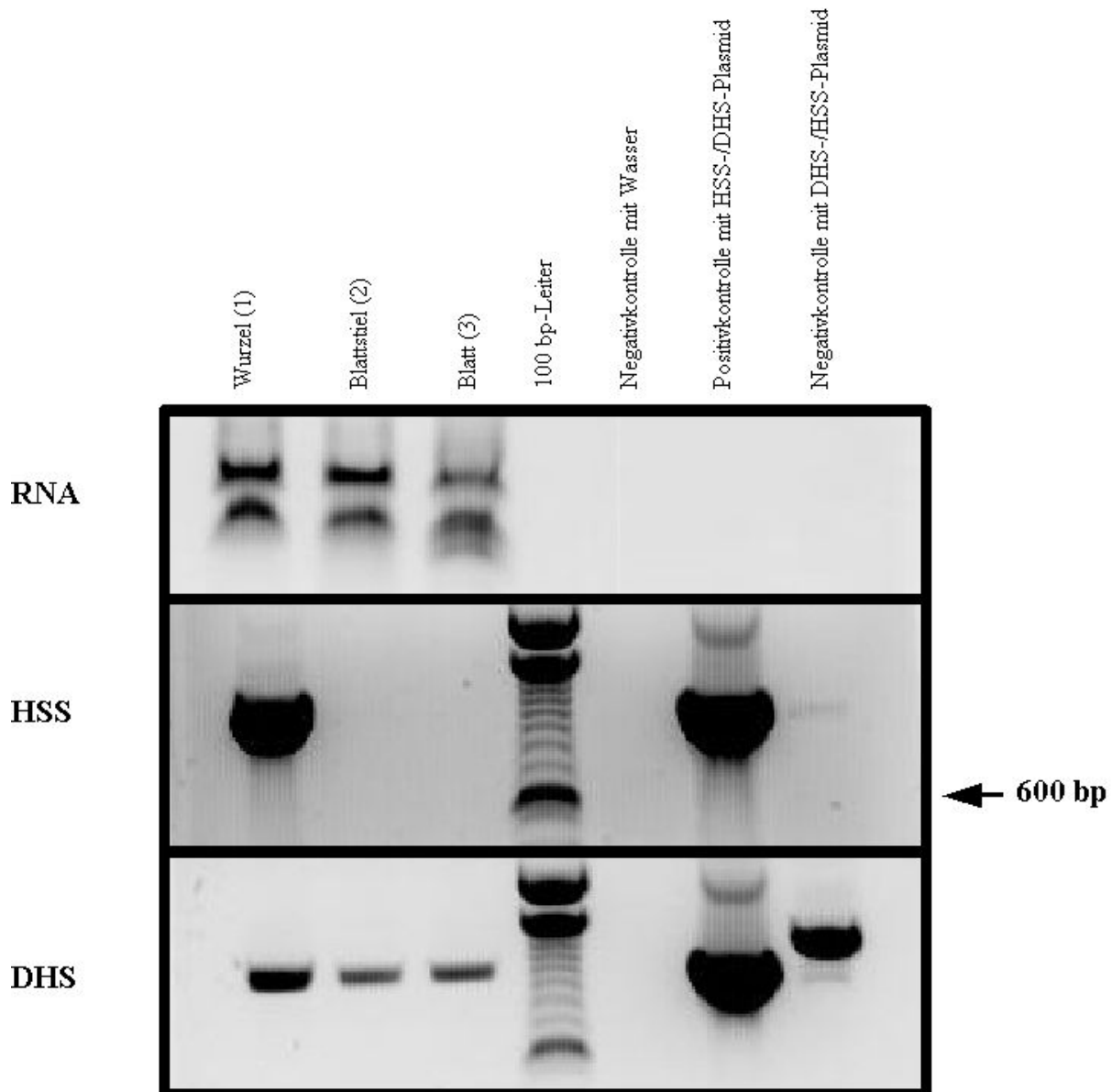
### 3.2.1.2 Transkriptionsanalyse der HSS und DHS in unterschiedlichen Pflanzengeweben von *Petasites hybridus*

Bei *P. hybridus* war bisher nicht bekannt, in welchen Pflanzenorganen die HSS transkribiert wird. Um dies festzustellen wurden von der Sterilkultur der Pflanze verschiedene Gewebe isoliert und zur Gewinnung von Gesamt-RNA eingesetzt. Bei den untersuchten Pflanzengeweben handelte es sich um die Wurzel, den Blattstiel und das Blatt (Abb. 3.14).



**Abb. 3.14:** Darstellung der für die RT-PCR verwendeten Pflanzenorgane von *P. hybridus*. (1, Wurzel; 2, Blattstiel; 3, Blattspreite).

Ein Transkript der HSS aus *P. hybridus* ist nur im Wurzelgewebe zu erkennen. In den oberirdischen Geweben, dem Blattstiel und dem Blatt, konnte hingegen kein Transkript nachgewiesen werden. Die DHS-Transkripte konnten wie bei den bereits zuvor untersuchten Pflanzen in allen Organen gefunden werden (Abb. 3.15).

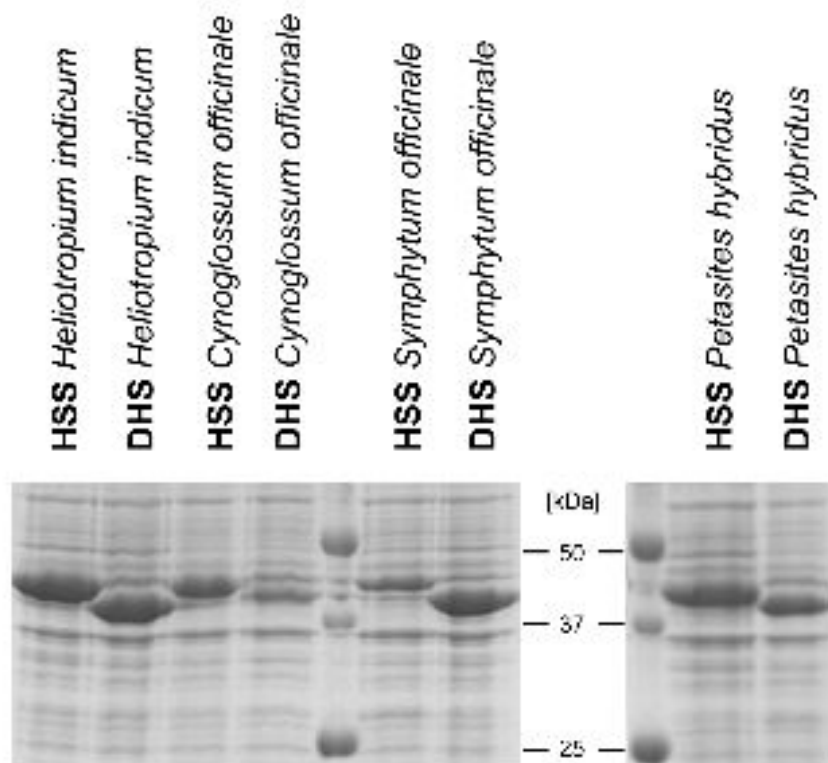


**Abb. 3.15: Quantitative Analyse der Gesamt-RNAs aus verschiedenen Organen von *P. hybridus* und deren vergleichend durchgeführte RT-PCR der HSS und DHS.** In einem Agarosegel wurden zur Qualitäts- und Quantifizierungskontrolle pro Spur 1 µg der Gesamt RNAs aufgetrennt, von den PCR-Ansätzen wurden danach 4 µl PCR-Produkt eingesetzt. Zahlen 1-3 siehe Abb. 3.14.

Dies Ergebnis bestätigt die bisherigen Untersuchungen an weiteren Vertretern der Asteraceae. So konnte an *Eupatorium cannabinum* (Asteraceae/Tribus Eupatorieae) auf Transkriptions- und Proteinebene gezeigt werden, dass nur die jährlich neu gebildeten jungen Wurzel dazu in der Lage sind, das HSS-Protein zu exprimieren (ANKE, 2004). Auch die Untersuchungen an *Senecio vernalis* (Asteraceae/Tribus Senecioneae) zeigten eine Expression der HSS ausschließlich im Wurzelgewebe (MOLL *et al.*, 2002).

### 3.3 Biochemische Charakterisierung der Proteine zur Identifikation der cDNAs, die für eine HSS oder DHS codieren

Zur Identifikation, ob es sich um eine HSS oder DHS handelt wurden die Proteine zunächst wie unter Kap. 2.5.14 beschrieben heterolog exprimiert und gereinigt (2.5.14.1). Die erfolgreiche Expression der Proteine ist im SDS-Gel (2.7.3) nach der Coomassie-Färbung (2.7.4.1) anhand der Banden bei etwa 45 kDa zu erkennen (Abb. 3.16).



**Abb. 3.16:** Überexpression der rekombinanten und gereinigten HSS und DHS aus *H. indicum*, *C. officinale*, *S. officinale* und *P. hybridus*. Gezeigt ist ein Coomassie-gefärbtes 12 % SDS Gel (2.7.3; 2.7.4.1).

Nach Umpuffern der gereinigten Proteine (2.7.2) wurden sie in den Enzymassays (2.7.6) hinsichtlich ihrer Aktivitäten überprüft und deren spezifische Aktivitäten errechnet (Tab. 3.19).

**Tabelle 3.19 Spezifische Aktivitäten von heterolog in *E. coli* exprimierten DHS- und HSS-codierenden cDNAs.**

cDNA/Pflanze	Sequenzlänge des ORF bp	DHS-Aktivität [pkat/mg]	HSS-Aktivität [pkat/mg]
HSS <i>Cynoglossum officinale</i>	1110	0,000	0,902
DHS <i>Cynoglossum officinale</i>	1119	0,036	0,113
HSS <i>Heliotropium indicum</i>	1095	0,000	0,666
DHS <i>Heliotropium indicum</i>	1116	0,155	0,238
HSS <i>Symphytum officinale</i>	1128	0,000	0,267
DHS <i>Symphytum officinale</i>	1119	0,165	0,479
HSS <i>Petasites hybridus</i>	1110	0,000	0,652
DHS <i>Petasites hybridus</i>	1098	0,018	0,048

Tabelle und Daten nach REIMANN *et al.* 2004, modifiziert

Es wurden bei den drei hier untersuchten Vertretern der Boraginaceae die jeweiligen cDNAs, die für eine HSS und DHS codieren, identifiziert. Weiterhin wurde in *Petasites hybridus*, einem Vertreter der Asteraceae, Tribus Senecioneae, die cDNAs, die für die HSS und DHS codieren identifiziert.

Alle cDNAs, die nur HSS-Aktivität zeigten, wurden als HSS charakterisiert; Proteine, die sowohl HSS- als auch DHS-Aktivität zeigten, als DHS charakterisiert (Tab. 3.19). Alle untersuchten DHS zeigten eindeutige Bindungsaffinitäten mit dem eiF5A-Substrat aus *S. vernalis*. (OBER und HARTMANN, 1999a). Sämtliche Aktivitäten waren in derselben Stärke, wie sie schon für die HSS und DHS aus *S. vernalis* im Detail gezeigt wurde (OBER und HARTMANN 1999a, 1999b; OBER *et al.*, 2003a).

### 3.4 Phylogenetischer Baum

Für die phylogenetischen Untersuchungen wurden die kompletten offenen Leserahmen aller bekannter pflanzlicher HSS und DHS, einschließlich der in dieser Arbeit identifizierten Sequenzen, herangezogen. In den Abbildungen 7.5 bis 7.12 im Anhang sind die cDNA-Sequenzen der hier untersuchten Boraginaceae, sowie der Asteraceae dargestellt.

Die mathematischen Berechnungen zum Erstellen dieses phylogenetischen Baumes wurden mit PHYLIP Version 3.6 durch OBER erstellt.

Der phylogenetische Baum (vgl. Abb. 4.1 in der Diskussion) zeigt ein unrooted maximum likelihood Phylogramm basierend auf den Nukleinsäuresequenzen dieser 23 cDNAs.

Das Phylogramm zeigt, dass die HSS aus der DHS während der Angiospermenevolution mehrmals unabhängig voneinander entstanden ist und zwar mindestens viermal. Einmal innerhalb der Monokotylen, einmal innerhalb der Boraginaceae und zweimal innerhalb der Asteraceae.

### 3.5 PCR mit genomischer DNA

Mit Hilfe identifizierter cDNA-Sequenzen, die für eine HSS und eine DHS codieren, sowie weiterer aus der Arbeitsgruppe und aus der Literatur bekannter HSS- und DHS-codierender cDNAs wurden die Berechnungen zum Erstellen eines phylogenetischen Baumes durchgeführt. Dabei ist jedoch nur ein Merkmal zur Berechnung herangezogen worden und zwar die cDNA-Sequenzen. Es sollten jedoch noch weitere Merkmale gefunden werden, die das Verzweigungsmuster dieses Baumes entweder unterstützen oder aber den Anlass dazu geben diese Daten zu verwerfen. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich die Exon-Intron-Strukturen der untersuchten Boraginaceae (*C. officinale*, *H. indicum* und *S. officinale*) und Asteraceae (*Petasites hybridus*) identifiziert. Auch *E. cannabinum*, eine Asteraceae (Tribus Eupatorieae), die in parallel durchgeführten Arbeiten intensiv mit molekularbiologischen und immunologischen Untersuchungen hinsichtlich der gewebe- und zellspezifischen Lokalisation der HSS (ANKE *et al.*, 2004) untersucht wurde, konnte dabei zur Identifizierung ihrer Exon-Intron-Struktur herangezogen werden. So ließe sich möglicherweise das Vorhandensein oder Fehlen von Introns innerhalb der *hss* und/oder *dhs* als phylogenetisches Merkmal heranziehen, um die Ergebnisse in den Sequenzcluster der Boraginaceae und Asteraceae (vgl. 4.1.2, Abb. 4.1) zu bestätigen oder zu widerlegen. Dabei könnten Lage, Phase und Größe der Introns als weitere Differenzierungsmerkmale dienen.

### 3.5.1 Exon-Intron-Struktur

Um die genomische Organisation der *hss*- und *dhs*-Gene aufzuklären wurde aus jungen Blättern der untersuchten Boraginaceae *C. officinale*, *H. indicum* und *S. officinale*, sowie den Asteraceae *P. hybridus* (Tribus Senecioneae) und *E. cannabinum* (Tribus Eupatorieae) genomische DNA mit dem Plant DNAzol-Reagenz isoliert (2.5.1.1.2). und unter Verwendung der jeweiligen Expressionsprimer (Tab. 7.1 im Anhang) amplifiziert (2.5.9). Bei der Amplifikation genomischer DNA wurde die Accu-Taq LA<sup>TM</sup>-DNA Polymerase von der Firma Sigma, wie im Herstellerprotokoll angegeben, eingesetzt. Weiterhin wurde die Elongationstemperatur von den typischen 72°C auf für die Accu-Taq-DNA-Polymerase optimale 68°C herabgesetzt, die Elongationszeit der Accu-Taq-DNA-Polymerase auf 10 Minuten bzw. 20 Minuten verlängert um größere Amplifikate zu erhalten.

Für die Amplifikation des *dhs*- und *hss*-Gens von *C. officinale* wurden die Primerpaare P76/P77 und P74/75 bei konstanten 65°C und 30 Zyklen verwendet (Tab. 7.2 im Anhang). Die hier entstandenen Amplifikate konnten direkt nach der Auftrennung in einem Low-Melt-Agarosegel in die PCR-Klonierungsvektoren (2.5.11.1) kloniert werden. Aus den positiv gescreenten Klonen wurde die Plasmid-DNA mit einem Kit isoliert (2.5.1.) und zur Sequenzierung geschickt. Das erhaltene *dhs*-Gen hatte eine Länge von 4034 bp, das *hss*-Gen 3800 bp (Tab. 7.2 im Anhang).

Bei *S. officinale* wurden dasselbe PCR-Temperaturprogramm und dieselbe Zyklenanzahl verwendet wie bei *C. officinale*. Als Primerpaare kamen für das *dhs*-Gen P78/P79 und für das *hss*-Gen P72/P73 zum Einsatz. Die daraus resultierenden amplifizierten Gene hatten eine Länge von 4378 bp und 1703 bp.

Genomische DNA aus *P. hybridus* wurde in einer PCR bei konstanten 68°C vervielfältigt. Als Primerpaare wurden ebenfalls die entsprechenden Expressionsprimer eingesetzt. Das mit dem Primerpaar P86/P87 amplifizierte *dhs*-Gen hatte eine Länge von 2221 bp, das über die Primer P84/P85 erhaltene Amplifikat des *hss*-Gens eine Länge von 1960 bp.

Das *dhs*-Gen aus *E. cannabinum* mit einer Länge von 2630 bp wurde mit dem Primerpaar P66/P67 bei denselben Bedingungen wie schon für *P. hybridus* beschrieben amplifiziert. Das 5056 bp große *hss*-Gen aus *E. cannabinum* konnte mit den Primern P64/P65 bei einer Elongationszeit von 20 Minuten erhalten werden.

Bei *H. indicum* wurde das 3175 bp lange *dhs*-Gen mit dem Primerpaar P82/P83 bei konstanten 65°C und 33 Zyklen amplifiziert. Das *hss*-Gen hingegen wurde durch Zufall bei der Suche nach dem möglichen Promotor der HSS mit der Inversen PCR gefunden. Wie es dazu kam ist



im Kapitel 3.5.2 ausführlich beschrieben. Als Ergebnis wurde ein *hss*-Gen mit einer Länge von 3180 bp identifiziert.

In vorhergehenden Arbeiten zur Untersuchung der HSS und DHS aus *Phalaenopsis* und *Crotalaria* Arten (NURHAYATI, 2004) wurden zusätzlich zu den funktionalen *hss*- und *dhs*-Genen prozessierte Pseudogene nachgewiesen. Auf die Existenz solcher prozessierter Pseudogene gibt es in den hier vorliegenden Untersuchungen keine Hinweise, da in einer PCR mit genomischer DNA, diese prozessierten Pseudogene als PCR-Produkte sichtbar gewesen wären, die ungefähr die Länge der entsprechenden HSS- und DHS-codierenden cDNAs aufweisen. Prozessierte Pseudogene entstehen durch Insertion revers transkribierter mRNAs in das Genom (Retrotransposition) und weisen daher keine Promotorbereiche auf. Darüberhinaus können sie aufgrund ihres Entstehungsmechanismus keine Introns besitzen (VANIN, 1985; ESNAULT *et al.*, 2000).

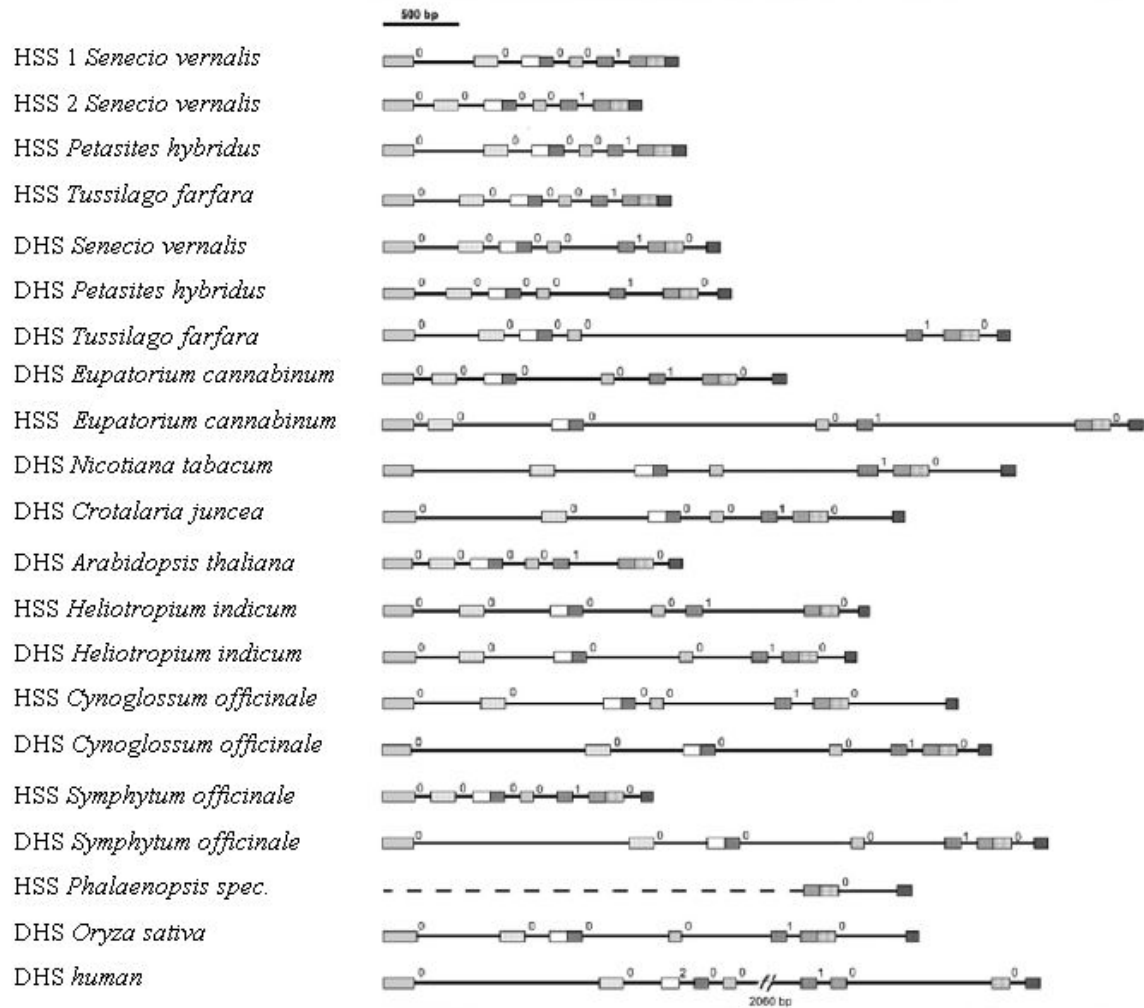
Alle identifizierten *dhs*- und *hss*-Gene sind länger als die jeweiligen cDNAs (vgl. Tab. 7.2 im Anhang). Die Unterschiede in den Längen variieren von 575 bp bei der HSS-cDNA und dem *hss*-Gen aus *S. officinale* bis hin zu 3928 bp bei der HSS-cDNA und dem *hss*-Gen aus *E. cannabinum*.

Mit Hilfe des GCG-Programmpaketes (Wisconsin-Computer Group) wurden die erhaltenen Sequenzen der Gene für die DHS (*dhs*) und die HSS (*hss*) auf die Anzahl und Lage möglicher Introns analysiert und in Abbildung 3.17a dargestellt. Dazu wurden die jeweiligen Gensequenzen mit ihren entsprechenden full length Sequenzen verglichen, um eine Aussage über die Anzahl, Lage, Phase und Position der Introns möglich zu machen. Das Alignment der genomischen Sequenzen von *dhs* und *hss* der untersuchten Boraginaceae *C. officinale*, *H. indicum* und *S. officinale* zeigt, dass die Anzahl der Introns und die Intronphasen übereinstimmen, nicht aber die Intronlänge (Abb. 3.17a). Bei der untersuchten Asteraceae *E. cannabinum*, Tribus Eupatorieae, kamen die Sequenzanalysen zu dem gleichen Ergebnis. Sowohl das Gen für die DHS, als auch das Gen für die HSS besitzen jeweils 6 Introns in identischer Position und Phase. Gleiches gilt auch für das *dhs*-Gen der Asteraceae *P. hybridus*, Tribus Senecioneae. Lediglich das *hss*-Gen der untersuchten Senecioneae besitzt 5 Introns identischer Position und Phase, wobei das letzte Intron (Intron 6) fehlt. Dieses Fehlen des letzten Introns konnte auch für die beiden *hss*-Gene (*hss1* und *hss2*) aus *S. vernalis*, einer weiteren Senecioneae, festgestellt werden (OBER, NURHAYATI und REIMANN, unveröffentlicht).

Pflanze	Gen	Exon 1		Exon 2		Exon 3		Exon 4		Exon 5		Exon 6		Exon 7	
		Intron 1		Intron 2		Intron 3		Intron 4		Intron 5		Intron 6			
<i>C. officinale</i>	<i>dhs</i>	210 bp	1163 bp	169 bp	468 bp	218 bp	754 bp	87 bp	314 bp	109 bp	88 bp	236 bp	129 bp	91 bp	
	IP		0		0		0		0		1		0		
<i>C. officinale</i>	<i>hss</i>	207 bp	438 bp	168 bp	641 bp	219 bp	81 bp	87 bp	743 bp	109 bp	132 bp	236 bp	655 bp	84 bp	
	IP		0		0		0		0		1		0		
<i>H. indicum</i>	<i>dhs</i>	219 bp	272 bp	168 bp	461 bp	219 bp	701 bp	87 bp	377 bp	109 bp	78 bp	236 bp	170 bp	78 bp	
	IP		0		0		0		0		1		0		
<i>H. indicum</i>	<i>hss</i>	201 bp	301 bp	168 bp	428 bp	219 bp	448 bp	87 bp	127 bp	109 bp	672 bp	236 bp	109 bp	75 bp	
	IP		0		0		0		0		1		0		
<i>S. officinale</i>	<i>dhs</i>	210 bp	1450 bp	168 bp	320 bp	219 bp	737 bp	87 bp	536 bp	109 bp	83 bp	236 bp	133 bp	90 bp	
	IP		0		0		0		0		1		0		
<i>S. officinale</i>	<i>hss</i>	222 bp	91 bp	168 bp	73 bp	219 bp	83 bp	87 bp	143 bp	109 bp	88 bp	239 bp	97 bp	84 bp	
	IP		0		0		0		0		1		0		
<i>P. hybridus</i>	<i>dhs</i>	210 bp	201 bp	168 bp	96 bp	219 bp	88 bp	87 bp	388 bp	106 bp	235 bp	236 bp	115 bp	72 bp	
	IP		0		0		0		0		1		0		
<i>P. hybridus</i>	<i>hss</i>	207 bp	458 bp	162 bp	142 bp	219 bp	88 bp	87 bp	81 bp	105 bp	82 bp	329 bp	fehlt!		
	IP		0		0		0		0		1				
<i>E. cannabinum</i>	<i>dhs</i>	210 bp	105 bp	168 bp	170 bp	219 bp	553 bp	87 bp	221 bp	106 bp	236 bp	236 bp	220 bp	99 bp	
	IP		0		0		0		0		1		0		
<i>E. cannabinum</i>	<i>hss</i>	213 bp	82 bp	168 bp	648 bp	218 bp	1560 bp	87 bp	172 bp	106 bp	1361 bp	236 bp	106 bp	99 bp	
	IP		0		0		0		0		1		0		

**Abb. 3.17a: Anzahl und Längen der Exons und Introns sowie die Intronphasen (IP) der aufgeführten *hss*- und *dhs*-Gene unterschiedlicher Organismen.** IP bezeichnet die Intronphase (Phase 0: Intron zwischen zwei Codons; Phase 1, Intron unterbricht Codon nach der ersten Base; Phase 2, Intron unterbricht Codon nach der zweiten Base).

Vergleicht man die *dhs* bisher untersuchter Pflanzen mit der des Menschen, so stimmt die Anzahl der Introns nicht überein. Die *dhs* des Menschen hat im Gegensatz zu den untersuchten Pflanzen 8 Introns, woraus folgt, dass es mindestens acht potentielle Stellen für Introns geben kann, die hochkonserviert sind, jedoch nicht alle „belegt“ sein müssen. Der Vergleich der genomischen Sequenzen von DHS und HSS zeigt konservierte Strukturen hinsichtlich der genomischen Organisation, die zusätzlich zu den anderen Gemeinsamkeiten die enge verwandtschaftliche Beziehung zwischen den beiden Genen unterstützt (Abb. 3.17b).



**Abb. 3.17b: Vergleich der Exon- und Intronstrukturen von *hss*- und *dhs*-Genen unterschiedlicher Organismen**

Homologe Exonbereiche sind durch identisch schraffierte Kästchen gekennzeichnet. Die Zahlen von 0 bis 2 markieren die Intronphasen (Phase 0: Intron zwischen zwei Codons; Phase 1, Intron unterbricht Codon nach der ersten Base; Phase 2, Intron unterbricht Codon nach der zweiten Base [Eigene Daten, Daten parallel durchgeführter Arbeiten am Institut für Pharmazeutische Biologie der AG OBER und Daten aus Gendatenbanken]).

Wie am Anfang des Kapitels beschrieben, wurden die genomischen Sequenzen analysiert, um über ein weiteres Merkmal das Verzweigungsmuster des Phylogenetischen Baumes (Abb. 4.1 in der Diskussion) zu bestätigen oder sogar zu verwerfen. Bezogen auf die Darstellung des phylogenetischen Baumes bedeutet dies, dass mit der zusätzlichen Information der genomischen Organisation der untersuchten HSS und DHS das erhaltene Verzweigungsmuster weder bestätigt noch widerlegt werden konnte.

### 3.5.2 Inverse PCR

Die bereits beschriebenen Untersuchungen zum Expressionsort des *hss*-Gens in *C. officinale* (3.1.1.3, 3.1.1.4), *H. indicum* (3.1.2.2) und *S. officinale* (3.1.3.2, 3.1.3.3) haben gezeigt, dass die HSS innerhalb der Boraginaceae trotz monophyletischen Ursprungs innerhalb dieser Familie (siehe Kapitel 3.4) sehr individuell exprimiert wird. Obwohl innerhalb der Boraginaceae die HSS aus der DHS nur einmal während der Angiospermenevolution entstanden ist, spricht ein monophyletischer Ursprung der HSS vorliegt (3.4), ist sie offensichtlich innerhalb der drei Vertreter unterschiedlich reguliert. Es gibt erste etablierte Systeme um transkriptionelle Regulation zu untersuchen (vgl. 2.10). Diese Untersuchungsmethoden basieren auf dem Postulat, dass transkriptionelle Regulation in erster Linie durch die Interaktion von DNA-bindenden Regulatorproteinen (Transkriptionsfaktoren) mit spezifischen DNA-Sequenzmotiven (cis-Elementen/Transkriptionsfaktorbindestellen) in der Promotorregion stattfindet. Wie sehen diese regulatorischen cis-Elemente der *hss*-Strukturgene der hier untersuchten Boraginaceae aus? Um eine Vorstellung davon zu gewinnen sollten mittels der Inversen PCR die potentiellen Promotorbereiche der jeweiligen HSS identifiziert und miteinander auf Gemeinsamkeiten untersucht werden.

Die für die Amplifikation in der PCR notwendigen Primer liegen in „inverser Orientierung“ (siehe 2.5.8) zwischen dem Start-ATG und der Restriktionsschnittstelle, wobei darauf zu achten ist, dass genügend bekannte codierende Sequenzabschnitte in Amplifikationsrichtung außerhalb des Primerbereiches liegen, um später durch diese Sequenzabschnitte die Spezifität der PCR-Reaktion überprüfen zu können. Niedrigere Denaturierungstemperaturen und kürzere Denaturierungszeiten sind bei der Amplifikation von genomischer DNA, neben den für die *Pfu*-DNA-Polymerase optimalen Elongationstemperaturen und –zeiten von Vorteil, da genomische DNA durch zu starke thermische Einflüsse Schaden nehmen kann.

Um eine Leserahmenverschiebung bei der später auszuwertenden Sequenz zu vermeiden wurde der Bereich zwischen den 5'-Enden der beiden verwendeten Primer mit Platzhaltern aufgefüllt, die der eigentlichen Anzahl der Nukleotide in der „full length“ Sequenz entspricht.

Die genomische DNA aus *C. officinale* wurde mit dem Restriktionsenzym *Bsa*AI geschnitten, die PCR erfolgte unter Verwendung von Primer PIP1 und PIP2 (PIP = **P**rimers **I**nverse **P**CR) bei einer konstanten Temperatur von 63°C für 33 Zyklen (Tab. 7.3 im Anhang). Das erhaltene Amplifikat mit dem potentiellen Promotorbereich hatte eine Länge von 2038 bp. Nach dem Einfügen der entsprechenden Anzahl fehlender Nukleotide in Form von „x“ (Bereich zwischen den beiden Primern) und dem Entfernen der mit der full length-Sequenz überlappenden

Sequenzbereiche hatte die Sequenz die vor dem Start-ATG identifiziert wurde eine Länge von 1854 bp.

Die genomische DNA aus dem jungen Blatt einer in Sterilkultur geführten Pflanze von *S. officinale* wurde mit dem Restriktionsenzym *DraI* geschnitten. In der PCR wurden die Primer PIP6 und PIP7 bei konstanten 60°C für 33 Zyklen eingesetzt, ein Amplifikat von 961 bp erhalten. Nach Korrektur war die Sequenz vor dem Start-ATG 532 bp lang. Neben der Sterilkultur von *Symphytum*, wurde zur Suche nach putativen Promotorsequenzen des *hss*-Gens, auch die Pflanze aus dem Arzneipflanzengarten des Institutes untersucht. Die hier ebenfalls aus dem jungen Blatt dieser Pflanze isolierte genomische DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *DraI* geschnitten und unter der Verwendung der Primer PIP6 und PIP7 bei konstanten 60°C für 33 Zyklen amplifiziert. Erstaunlich war, dass die PCR 2 Amplifikate unterschiedlicher Größe lieferte. Nach Sequenzierung, Sequenzanalyse und Korrektur um die noch fehlenden Basen konnten vor dem Start-ATG Sequenzen mit einer Gesamtgröße von 533 bp und 736 bp identifiziert werden. Da in der Sequenz des kleineren Amplifikates die Sequenz des Primers PIP 6 nicht identifiziert werden konnte, könnte dieses PCR-Produkt zumindest teilweise ein Religationsartefakt darstellen, daher wird es bei der weiteren Betrachtung nicht berücksichtigt.

Die Suche nach dem Promotorbereich von *H. indicum* war etwas schwieriger. Die genomische DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *AflIII* geschnitten, die PCR mit den Primern PIP3 und PIP4 bei konstanten 60°C für 33 Zyklen durchgeführt. Nach Vergleich der erhaltenen Sequenz mit der full length cDNA der HSS aus *H. indicum* wurde festgestellt, dass es sich nicht um den eigentlich gesuchten Promotor handelte sondern um einen 2608 bp großen Teil der Exon/Intron-Struktur des Gens. Es stellte sich heraus, dass sich innerhalb der ausgewählten *AflIII*-Restriktionsschnittstelle der full length cDNA das erste Intron des Gens befindet, die Restriktion an dieser vorhergesagten Stelle also nicht stattfinden konnte. Die erhaltene Exon/Intron-Sequenz des *hss*-Gens endete im fünften Intron.

Um nun die vollständige Exon/Intron-Struktur des *hss*-Gens zu identifizieren wurde die genomische DNA mit dem Restriktionsenzym *HincII* geschnitten und mit den Primern PIP5 und P81 bei konstanten 60°C für 33 Zyklen amplifiziert. Der Forward-Primer PIP5 liegt 70 bp downstream der *HincII*-Schnittstelle im Intron 5. Der Reverse-Primer P81, bei dem es sich um den Reverse-Expressionsprimer der HSS aus *H. indicum* handelt, liegt am 3'-Ende des gesuchten Gens. Dadurch dürfte die noch fehlende Exon/Intron Struktur des *hss*-Gens komplettiert werden. Das so erhaltene Amplifikat hatte eine Länge von 1038 bp. Nach Sequenz-

vergleich mit der bereits vorhandenen Gensequenz der HSS konnte die eigentliche Exon/Intron-Struktur des *hss*-Gens mit einer Länge von 3180 bp identifiziert werden.

Um den Promotor der HSS aus *H. indicum* zu finden wurde die genomische DNA mit dem Restruktionsenzym *BtgI*, das im ersten Intron schneidet, geschnitten. Die anschließende PCR wurde mit den Primern PIP3 und PIP4 bei konstanten 65°C und einer verlängerten Elongationszeit von 8 min für 35 Zyklen durchgeführt. Das Amplifikat hatte eine Länge von 5807 bp, nach Sequenzanalyse und Korrektur konnte vor dem Start-ATG eine Sequenz mit einer Gesamtlänge von 5510 bp ermittelt werden, die den putativen Promotor enthalten sollte.

### 3.5.2.1 Bioinformatische Promotoranalyse

Die Expression der DHS- und HSS-Gene ist im pflanzlichen Stoffwechsel differentiell reguliert. DHS-Proteine sind ubiquitär im Primärstoffwechsel exprimiert, während HSS-Proteine im Sekundärstoffwechsel eine hohe gewebespezifische Expression zeigen (ANKE *et al.*, 2004; MOLL *et al.*, 2002). Um einen ersten Einblick in diese transkriptionelle Regulation dieser unterschiedlichen Expressionsmuster zu bekommen, wurden die potentiellen Promotorsequenzen zunächst auf gemeinsam auftretende Transkriptionsfaktorbindungsstellen (TFBs) untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Sequenzen (1000 bp upstream vom „Start-ATG“) mittels Alignment Matrizen bekannter TFBs aus *Arabidopsis* durchsucht. Diese Analyse erbrachte keine signifikanten Treffer die bei allen Sequenzen gemeinsam auftraten, auch die Treffer in einzelnen Sequenzen wiesen keine signifikanten Irrtumswahrscheinlichkeiten auf (HERTZ und STORMO, 1999). Im Rahmen dieser Untersuchung fiel auf, dass der potentielle Promotor der DHS aus *S. vernalis* (*Svdhs*) offensichtlich ein Intron in der 5'UTR zwischen –1064 und –6 bzgl. ATG aufweist. Daraufhin wurde der Datensatz überarbeitet, indem das Intron herausgeschnitten wurde. Außerdem wurden wegen der kurzen Sequenz des potentiellen *hss*-Gens aus *S. officinale* (532 bp) alle putativen Promotorsequenzen auf 464 bp upstream des Transkriptionsstartes beschnitten. Dies war notwendig, da für die Motivsuche in mehreren Sequenzen gleichzeitig, die Sequenzen identische Längen aufweisen müssen (vgl. 2.11.1.1). Der mögliche Transkriptionsstart wurde durch ein Alignment der 5'-RACE Sequenzen mit den jeweiligen potentiellen Promotoren ermittelt, wobei das Alignment der jeweiligen 5'-UTRs nicht immer eine 100 %ige Sequenzidentität aufwies. Diese Sequenzunterschiede sind nicht ungewöhnlich, da die untersuchten Pflanzen mindestens diploide Chromosomensätze aufweisen und es sich bei dem Vergleich der 5'-UTR des potentiellen Promotors mit der 5'-UTR der 5'-RACE Sequenz um Allele handeln könnte.

Die einzigen konservierten Elemente, die mit dieser Methode (2.11.1) ermittelt werden konnten, waren die potentiellen TATA-Boxen (definiert durch die Matrix von SHAHMURADOV *et al.*, 2003). Während die Promotoren von *Cohss*, *Hihss*, *Sohss* und *Svdhs* konservierte TATA-Boxen im charakteristischen Abstand von etwa 30–25 bp upstream des Transkriptionsstartes aufweisen, ist die Lage der TATA-Box-ähnlichen Sequenzabschnitte von *Atdhs* bei –230 und *Ntdhs* bei –125 untypisch (Tab. 3.19 und Abb. 7.12 im Anhang). Daher ist es fraglich ob sie als TATA-Boxen fungieren.

**Tabelle 3.19: Position und Sequenz potentieller TATA-Boxen**

Pflanze/Gen	Sequenz	Position upstream Transkriptionsstart
<i>C. officinale hss</i>	CTATATAAT	-36 bis -28
<i>H. indicum hss</i>	TCTATAAAA	-35 bis -27
<i>S. officinale hss</i> (sterile Pflanze, 532 bp)	GTATATAAA	-36 bis -28
<i>S. officinale hss</i> (Gartenpflanze, 736 bp)	CTATATAAT	-36 bis -28
<i>S. vernalis dhs</i>	ATATATATA	-37 bis -29
<i>A. thaliana dhs</i>	TTATAATTC	-238 bis -230
<i>N. tabacum dhs</i>	ATATATTAA	-133 bis -125

## 4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Evolution der Pyrrolizidinalkaloidbiosynthese, speziell der HSS, dem Eingangsenzym der PA-Biosynthese und ihrem phylogenetischen Vorfahr, der DHS, innerhalb der Angiospermen genauer zu untersuchen. Innerhalb der Angiospermen kommen PAs nur in einigen nicht nahe miteinander verwandten Pflanzenfamilien vor (z.B. Asteraceae, Boraginaceae, Orchidaceae und Fabaceae). Dieses ungleichmäßige Vorkommen von PAs warf die Frage auf, ob die HSS aus der DHS während der Angiospermenevolution nur einmal oder mehrmals unabhängig entstanden ist, sprich ist sie monophyletischen oder polyphyletischen Ursprungs. Besonderes Augenmerk lag dabei in der Untersuchung einiger Vertreter der Pflanzenfamilie der Boraginaceae. Dazu wurden zunächst die cDNA-Sequenzen der ubiquitären DHS und der PA-spezifischen HSS in den drei untersuchten Vertretern der Boraginaceae (*Cynoglossum officinale*, *Heliotropium indicum* und *Symphytum officinale*) und einem Vertreter der Asteraceae Tribus Senecioneae (*Petasites hybridus*) identifiziert und kloniert, um die rekombinanten Proteine nach erfolgter Expression biochemisch zu charakterisieren und anhand ihrer cDNA-Sequenzen phylogenetisch einzuordnen.

### 4.1.1 Biochemische Charakterisierung

#### 4.1.1.1 Die biochemischen Funktionen des DHS-HSS Systems

Streng konservierte biochemische Funktionen und hohe Konserviertheit innerhalb der Sequenzen sind die charakteristischen Eigenschaften des DHS Systems (BARTIG *et al.*, 1992; GORDON *et al.*, 1987). Die DHS katalysiert den ersten Schritt der posttranslationalen Aktivierung des regulatorischen Proteins eIF5A durch die Modifizierung eines spezifischen protein-gebundenen Lysinrestes (PARK *et al.*, 1997). Für das korrekte Binden des Substratproteins an das Enzym sind sowohl die Aminosäurereste auf der Oberfläche als auch die Aminosäurereste im aktiven Zentrum des Enzyms notwendig. Demnach sind das Vorhandensein bestimmter Aminosäuren und deren Position in der DHS-Sequenz von immenser Bedeutung für die enzymatische Aktivität. Durch die starke Selektion, die auf dem hochkonservierten DHS-System liegt, sind diese Aminosäuren weitgehend unverändert geblieben. Nicht nur die Sequenz ist innerhalb dieses Systems konserviert, sondern auch dessen Wirkungsweise. Dadurch ist es möglich, dass ein eIF5A-Substratprotein eines bestimmten Eukaryonten als Substrat für das DHS-Protein in vielen verschiedenen Eukaryonten fungiert. So wird z.B. das eIF5A-Substrat aus dem Pilz *Neurospora crassa* von der DHS des Menschen akzeptiert (YAN *et al.*,



1996). Das DHS-Protein der Hefe zeigt sogar Aktivität mit dem eIF5A-Substratprotein aus dem Menschen (SCHWELBERGER *et al.*, 1993, MAGDOLEN *et al.*, 1994; KANG *et al.*, 1995), aus CHO-Zellen (KANG *et al.*, 1995) und aus *Dictyostelium discoideum* oder *Medicago sativa* (MAGDOLEN *et al.*, 1994). In den hier durchgeführten DHS-Assays konnte gezeigt werden, dass das eIF5A-Substratprotein aus *S. vernalis* von allen hier untersuchten DHS-Proteinen modifiziert wurde. Die HSS, das erste stoffwechselspezifische Enzym der PA-Biosynthese besitzt zusammen mit der DHS einen gemeinsamen Vorfahr, aus dem beide Enzyme durch Genduplikation entstanden sind (OBER und HARTMANN, 1999a, 2000). Obwohl beide Enzyme in vollkommen unterschiedliche metabolische Prozesse des pflanzlichen Stoffwechsels involviert sind (Proteinmodifikation im Falle der DHS im Gegensatz zur Biosynthese pflanzlicher Abwehrstoffe durch die HSS), besitzen beide neben einem hohen Grad an Sequenzidentität auch viele gemeinsame biochemische Eigenschaften wie pH-Abhängigkeit, molekulare Organisation (wird später ausführlicher diskutiert), Substratspezifität und Substratkinetiken. Andererseits zeigt sich aber ein entscheidender Unterschied, denn die HSS ist nicht mehr in der Lage das eIF5A-Substratprotein zu binden (OBER und HARTMANN, 1999a; OBER *et al.*, 2003).

#### 4.1.1.2 Die biochemischen Eigenschaften der HSS

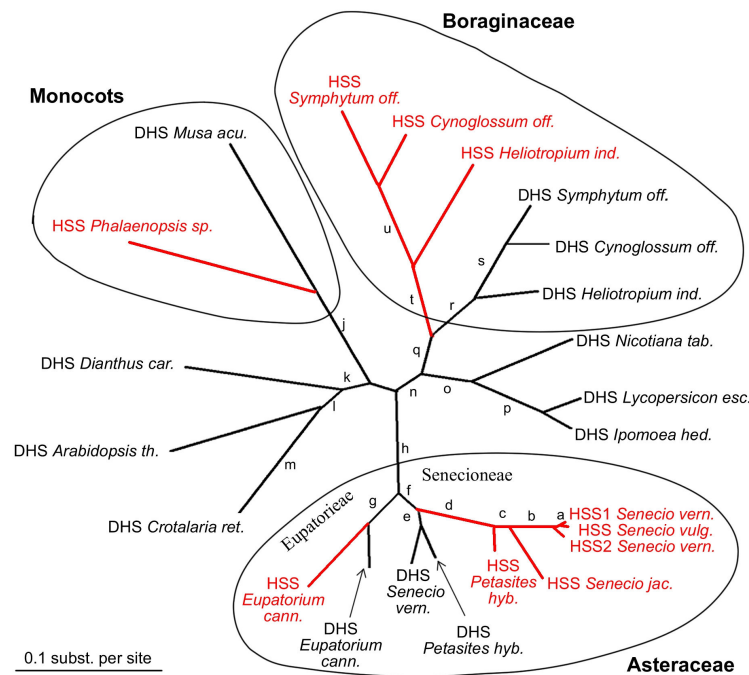
Es ist bemerkenswert, dass alle hier untersuchten und identifizierten HSS die proteinmodifizierende Eigenschaft der DHS verloren haben (Tab. 3.19). Es muss eine den Stoffwechsel betreffende Notwendigkeit gegeben haben, die DHS-Aktivität der HSS auszuschalten. Mechanistische und regulatorische Prozesse können innerhalb einer Pflanze die Ursache dafür sein, dass zwei unabhängige Gene, die dieselbe essentielle Funktion aufweisen, nicht toleriert werden. Ein dupliziertes Protein, das in Interaktionen mit weiteren Proteinen involviert ist, kann diese Protein-Protein-Interaktionen negativ beeinflussen, weil z.B. Mutationen die Struktur verändern (HUGHES und HUGHES, 1993). Ist diese Protein-Protein-Interaktion beispielsweise genauso essentiell für den Organismus, wie DHS und eIF5A, dann würde eine Genkopie mit derselben Funktion möglichst schnell eliminiert werden. Möglicherweise können nur die Genkopien, die ihre DHS-Aktivität verloren haben weiter existieren, dann aber unter einem neuen Selektionsdruck eine neue Funktion entwickeln, wie es im Hinblick der verbleibenden HSS-Aktivität der Fall ist. Diese Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, dass in allen bisher komplettierten eukaryotischen Genomprojekten die DHS ein „single copy“-Gen ist. In weiterführenden Arbeiten wird die Identifizierung der ausgetauschten Aminosäuren im HSS-Protein, die zum Verlust der DHS-Aktivität geführt haben untersucht, um diese Hypothese zu unterstützen (persönliche Mitteilung OBER).

Ein Vergleich von den 23 für die phylogenetischen Analysen herangezogenen cDNAs mit der DHS-Sequenz des Menschen, von der eine dreidimensionale Struktur zur Verfügung steht, hat gezeigt, dass der Verlust der DHS-Aktivität während der HSS-Rekrutierung nicht an den Modifikationen im aktiven Zentrum liegt, sondern an dem Unvermögen das eIF5A-Substratprotein an der Enzymoberfläche zu binden (REIMANN *et al.*, 2004). Diese Beobachtung wird durch die vergleichende Analyse der kinetischen Eigenschaften der DHS und HSS aus *S. vernalis* verdeutlicht (OBER *et al.*, 2003a). Beide Enzyme zeigten die gleichen Substratspezifitäten und spezifischen Aktivitäten und weisen nahezu identische Michaelis-Menden-Kinetiken für die Aminobutylierung von Putrescin auf. Weiterhin konnte von OBER *et al.* (2003a) in einem Chromatographieversuch mit einem immobilisierten eIF5A-Substratprotein die Unfähigkeit der HSS dieses Protein zu binden gezeigt werden. Die reduzierte Anzahl „unveränderbarer“ Stellen (nicht austauschbarer AS) innerhalb der HSS-cDNAs im Vergleich zu den paralogen DHS-cDNAs könnte verschiedene Ursachen haben. Eine Ursache könnte eine höhere Sequenzevolution innerhalb der HSS-codierenden „Linien“ sein. Dies wurde auch schon als Konsequenz anderer Genduplikationen beschrieben. Als Ursache wird ein geringerer Selektionsdruck auf einer der Genkopien postuliert (LI, 1985; AXELSEN und PALMGREEN, 1998). Eine weitere Ursache könnte ein größerer Anteil nichtsynonymer Mutationen innerhalb der HSS-codierenden Sequenzen sein. Längere Verzweigungsäste der HSS-Sequenzen innerhalb der Boraginaceae und Asteraceae im Phylogramm (Abb. 4.1) deuten auf einen größeren Anteil an Sequenzevolution im Vergleich mit ihren paralogen DHS Sequenzen hin. Die von OBER durchgeführten Quantifikationen dieser Unterschiede durch Kalkulation der Aminosäureabstände ( $d_{aa}$ ) und Nukleinsäureabstände ( $d_{na}$ ) innerhalb der zwei Familien, zeigten längere Abstände zwischen den paralogen DHS- und HSS-Sequenzen, als für die orthologen DHS-Sequenzen (REIMANN *et al.*, 2004). Darüber hinaus ist die Rate der nichtsynonymen Substitutionen innerhalb dieser Linien erhöht. Zusammengefasst lässt sich also sagen: Die Erhöhung von  $\omega$  (ein Maß für den Selektionsdruck auf Proteinebene) und die Modifikationen innerhalb des HSS-codierenden Gens führten dazu, dass die HSS unfähig ist das eIF5A-Substratprotein zu binden. Daraus resultierend liegen abnehmende funktionale Zwänge auf dem HSS-codierenden Gen.

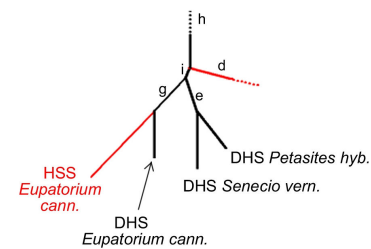
#### 4.1.2 Die Phylogenie von DHS und HSS

Gemeinsam mit weiteren aus der Arbeitsgruppe charakterisierten cDNAs, die für die jeweiligen HSS und DHS codieren, wurden zusätzlich die DHS-Sequenzen von der Banane (*Musa acuminata*), Tomate (*Lycopersicon esculentum*), Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) und Nelke (*Dianthus caryophyllus*) (WANG *et al.*, 2001) für die phylogenetischen Berechnungen herangezogen, so dass letztlich 23 Sequenzen zur phylogenetischen Analyse zur Verfügung standen. Die hier erwähnten Berechnungen zum Erstellen phylogenetischer Bäume wurden von OBER durchgeführt. Alle Verzweigungsmuster der Bäume, die nach den neighbour joining-, maximum parsimony- und maximum likelihood-Methoden erstellt wurden, zeigten, dass die HSS aus der DHS während der Angiospermenevolution mehrmals unabhängig voneinander entstanden ist.

Abbildung 4.1 zeigt ein „unrooted maximum likelihood“ Phylogramm, das auf den Nukleinsäuresequenzen dieser 23 cDNAs basiert. Das Verzweigungsmuster des Baumes bestätigt vier unabhängige, durch Genduplikation entstandene Ursprünge des HSS-codierenden Gens aus Vorfahren des heutigen DHS-codierenden Gens. Die HSS ist einmal sehr früh in der Evolution der Boraginaceae, einmal innerhalb der Monokotylen und zweimal innerhalb der Asteraaceae entstanden. Nur die Triben Eupatorieae und Senecioneae innerhalb der Familie der Asteraceae besitzen PA-haltige Vertreter. In jeder dieser Triben wurde die HSS aus der DHS einmal unabhängig voneinander rekrutiert. Phylogenetische Analysen der Asteraceae bestätigten, dass die Triben Senecioneae und Eupatorieae keine „sister groups“ sind (KIM und JANSEN, 1995; JANSEN und KIM, 1996; BAYER und STARR, 1998). Weitere Phylogramme, die durch verschiedene Algorithmen oder durch die Verwendung der Aminosäuresequenzen anstelle der Nukleinsäuresequenzen von OBER erstellt worden sind, zeigten nahezu identische Verzweigungsmuster mit diesen vier unabhängigen Ursprüngen der HSS (Abb. 4.1). Die Verzweigungsmuster unterscheiden sich vor allem nahe der Stelle, wo sich die Familie der Asteraceae in die zwei Triben Eupatorieae und Senecioneae aufspaltet (Abb. 4.1). Zeigt das bevorzugte Verzweigungsmuster die Rekrutierung der HSS innerhalb der Senecioneae nach dem Aufspalten in die zwei Triben, so wird die HSS in der alternativen Darstellung vor der Aufspaltung rekrutiert. Nach dieser Darstellungsweise müsste ein gemeinsamer Vorfahr der Eupatorieae und Senecioneae die HSS besessen haben. Da jedoch zurzeit ein unabhängiger Ursprung der HSS innerhalb der Eupatorieae eindeutig belegt ist, würde dies den Verlust einer HSS zu Beginn der Entstehung der Eupatorieae voraussetzen.

**A** Bevorzugte Topologie**B** Alternative Topologie

innerhalb der Asteraceae



**Abb. 4.1:** „Unrooted Maximum Likelihood Tree“ basierend auf 23 HSS- und DHS-codierender cDNA-Sequenzen verschiedener Angiospermen Arten [nach REIMANN *et. al.*, 2004].

(A) Bevorzugte Topologie. HSS-Sequenzen sind in rot dargestellt, DHS-Sequenzen in schwarz. Die Astlängen sind errechnet worden über „maximum likelihood“, was auf dem Jones-Taylor-Thornton Modell basiert.

(B) Alternative Topologie die in einigen Phylogrammen für die Sequenzen der Asteraceae gefunden wurde.

Abkürzungen sind wie folgt: *Symphytum off.*, *Symphytum officinale*; *Cynoglossum off.*, *Cynoglossum officinale*; *Heliotropium ind.*, *Heliotropium indicum*; *Nicotiana tab.*, *Nicotiana tabacum*; *Lycopersicon esc.*, *Lycopersicon esculentum*; *Ipomoea hed.*, *Ipomoea hederifolia*; *Senecio vern.*, *Senecio vernalis*; *Senecio vulg.*, *Senecio vulgaris*; *Senecio jac.*, *Senecio jacobaea*; *Petasites hyb.*, *Petasites hybridus*; *Eupatorium cann.*, *Eupatorium cannabinum*; *Crotalaria ret.*, *Crotalaria retusa*; *Arabidopsis th.*, *Arabidopsis thaliana*; *Dianthus car.*, *Dianthus caryophyllus*; *Musa acu.*, *Musa acuminata*.

Zur genaueren Untersuchung der Phylogenie wurden paarweise Vergleiche DHS- und HSS-codierender cDNAs innerhalb der Boraginaceae und innerhalb der Asteraceae durchgeführt. Dazu wurden von Ober die Aminosäure-Abstände ( $d_{aa}$ ) und Nukleinsäure-Abstände ( $d_{na}$ ) berechnet.

Der Aminosäure-Abstand ist definiert als die Anzahl der ausgetauschten Aminosäuren pro Anzahl der Sequenzpositionen im „Alignment“, korrigiert um multiple Substitutionen an derselben Stelle.

Der Nukleinsäure-Abstand ist definiert als die Anzahl ausgetauschter Nukleotide bezogen auf die Sequenzlänge, korrigiert um multiple Substitutionen an derselben Stelle und um verschiedene Substitutionsraten an verschiedenen Codonpositionen.

Die Berechnungen von  $d_{aa}$  zeigten ein relativ geringes Maß an Sequenzdivergenz zwischen den orthologen DHS-Sequenzen innerhalb der Boraginaceae und innerhalb der Asteraceae ( $d_{aa}$  zwischen 5,9 und 13,5 %). Andererseits ist  $d_{aa}$ , wenn die paralogen DHS und HSS ein und derselben Spezies verglichen werden, erhöht ( $d_{aa}$  von 27,7 bis 31,1 % bei den Boraginaceae und von 17,1 bis 23,5 % bei den Asteraceae). Ähnliches lässt sich auch bei der Berechnung der  $d_{na}$  feststellen. Innerhalb der Boraginaceae liegt der  $d_{na}$  bei den orthologen DHS-Sequenzen zwischen 10,5 und 21,1 % bei den paralogen DHS- und HSS-Sequenzen derselben Art jedoch zwischen 33,8 und 45,2 %. Bei den Asteraceae lag  $d_{na}$  für die orthologen DHS-Sequenzen zwischen 9,3 und 18,3 %,  $d_{na}$  paraloger DHS- und HSS-Sequenzen derselben Art variierten zwischen 16,0 und 23,7 %. Innerhalb der Familie der Boraginaceae ist der Unterschied zwischen den funktionell identischen orthologen HSS-Sequenzen nicht so groß, wie es für die paralogen DHS- und HSS-Sequenzen einer Art der Fall ist, aber immer noch höher als für die orthologen DHS-Sequenzen ( $d_{aa}$  von 9,4 bis 19,7 %;  $d_{na}$  von 16,0 bis 35,9 %). Dies weist auf einen reduzierten Selektionsdruck, der auf den HSS-Sequenzen liegt, hin, was möglicherweise an der reduzierten Anzahl unveränderbarer notwendiger Positionen in den Aminosäuresequenzen liegt. Bei der Familie der Asteraceae finden wir eine vergleichbare Situation, wenn wir die HSS-Sequenzen der zwei Arten des Tribus der Senecioneae vergleichen ( $d_{aa} = 9,7$  %;  $d_{na} = 11,6$  %). Vergleicht man stattdessen die zwei HSS-Sequenzen der Senecioneae mit der HSS-Sequenz aus *Eupatorium cannabinum* vom Tribus der Eupatorieae, so sind diese funktionell identischen Orthologen unterschiedlicher, als die paralogen DHS- und HSS-Sequenzen derselben Art, was wiederum die zwei unabhängigen Rekrutierungen der HSS in den Triben Eupatorieae und Senecioneae innerhalb der Familie der Asteraceae stützt.

Bei dem Erstellen phylogenetischer Bäume, die als ein Modell der Entstehung von Genen oder Genfamilien dienen, gibt es ein grundlegendes Problem. Im Gegensatz zu einem „species tree“ (Artenbaum) basieren die hier erhobenen Daten einzig und allein auf einem Merkmal und zwar den jeweiligen cDNA-Sequenzen, die für die DHS- und HSS-Proteine codieren. Aus diesem Grund wurden die analysierten und identifizierten genomischen Strukturen ausgewählter DHS- und HSS-codierender Sequenzen aus den Asteraceae und Boraginaceae, sowie *N. tabacum*, *Crotalaria* und *Phalaenopsis* herangezogen (OBER, NURHAYATI und REIMANN, unveröffentlicht). Im Vergleich mit dem *dhs*-Gen des Menschen, das acht Introns enthält, besitzen die hier untersuchten *dhs*- und *hss*-Gene und das *dhs*-Gen aus *Arabidopsis* sechs Introns, die sich an identischer Position und in identischen Phasen befinden. Nur die beiden *hss*-Gene aus *Senecio vernalis* besitzen fünf Introns, wobei das sechste Intron fehlt. Die Position und Phase in der sich die fünf vorhandenen Introns befinden stimmt mit denen der ande-

ren Introns überein. Mit diesen konservierten Intron-Exon-Strukturen der genomischen Sequenzen konnte nun nach weiteren Berechnungen festgestellt werden, ob durch „concerted evolution“ eine andere Phylogenie, als die in Abb. 4.1 dargestellte, erhalten wird. Für die hier bevorzugte Phylogenie (Abb. 4.1 A) wurden die neun vorhergesagten potentiellen Exons aller cDNA-Sequenzen zur Berechnung herangezogen. Die Berechnungen (neighbour joining tree und maximum likelihood) mit den dazu homologen Exons, die individuell verglichen wurden, zeigten kein identisches Verzweigungsmuster für alle Exons. Somit konnte weder eine Bestätigung für unsere Phylogenie noch ein gemeinsamer Cluster aller HSS-codierenden Sequenzen (OBER, unveröffentlicht) festgestellt werden.

Kein Verzweigungsmuster, dass unabhängig der neun potentiellen Exons erstellt wurde, spaltet die DHS- und HSS-codierenden Sequenzen in zwei Cluster auf. Weiterhin sind die Nukleotidsequenzunterschiede der paralogen analysierten Gene deutlich verschieden ( $> 10\%$ ; REIMANN *et al.*, 2004). Aber auch die Unfähigkeit des HSS-Proteins das eIF5A-Substratprotein zu binden zeigt, dass die *dhs*- und *hss*-Gene, mit Ausnahme ihrer biochemischen Gemeinsamkeiten eher divergieren anstatt ähnlicher zu werden. Es gibt somit keinen Hinweis darauf, dass es für die HSS-codierenden Sequenzen in der frühen Angiospermenevolution einen gemeinsamen Vorfahr gegeben haben könnte. Der Ursprung der HSS-codierenden Sequenzen wurde also nicht durch die Mechanismen der „concerted evolution“ in der späteren Entwicklung maskiert.

Es wird angenommen, dass „concerted evolution“ einen möglichen monophyletischen Ursprung paraloger Sequenzen verschleiert (ZIMMER *et al.*, 1980). Homologe Gene entwickeln sich nicht unabhängig voneinander, sondern tauschen genetisches Material miteinander aus, was zu einer sehr starken Sequenzidentität innerhalb der Familie führt. „Concerted evolution“ findet hauptsächlich in Multigenfamilien, die ein hohes Maß an Sequenzidentität aufweisen, in Form von sich wiederholenden Sequenzaustauschen, statt. Diese Nukleotidunterschiede innerhalb der Multigenfamilien liegen nicht über 1 bis 3 % (LI, 1997; SWANSON and VACQUIER, 1998) wobei LI (1997) feststellte, dass nur einzelne Abschnitte der homologen Gene ausgetauscht werden. Obwohl in den PA-haltigen Pflanzen bisher nichts über die genaue Anzahl der DHS- und HSS-codierenden Gene und Pseudogene bekannt ist, gibt es doch einige deutliche Hinweise darauf, dass „concerted evolution“ keinen starken Einfluss auf die phylogenetische Sequenzanalyse hat. In allen bisher untersuchten und abgeschlossenen eukaryontischen Genomprojekten hat sich gezeigt, dass die DHS nicht durch eine Multigenfamilie codiert wird, somit gibt es keine Anzeichen für eine gleichzeitige Organisation innerhalb der PA-produzierenden Pflanzen.

#### 4.1.2.1 Genduplikationen des *dhs*-Gens

Genduplikationen treten in Genomen relativ häufig auf und üben somit einen großen Einfluss auf die Entstehung neuer biologischer Funktionen aus (WAGNER, 1998; KONDRASHOV *et al.*, 2002). Größtenteils wird bei diesen Genduplikationen jedoch eine der Genkopien durch zerstörende Mutationen in ein Pseudogen überführt. In einigen seltenen Fällen wiederum könnte eine der Genkopien durch günstige förderliche Mutationen eine vollkommen andere Funktion hervorbringen. In Anlehnung an das von HUGHES (1994) vorgeschlagene Modell könnte dem Entstehen zweier funktionell verschiedener Tochtergene ein über einen längeren Zeitraum existierendes bifunktionales Ursprungsgen vorausgegangen sein. Diese Bifunktionalität wird in unserem Fall durch das DHS-Protein realisiert, dessen natürliche Nebenfunktion, die Synthese von Homospermidin, zur späteren Hauptfunktion der Genkopie führt. Das HSS-codierende Gen hingegen hat die proteinmodifizierende Eigenschaft des DHS-codierenden Gens verloren und wurde somit dem starken Selektionsdruck, der auf dieser essentiellen Reaktion des Primärstoffwechsels liegt, entzogen. Durch die verbleibende Fähigkeit Homospermidin zu synthetisieren, konnte unter einem neuen Selektionsdruck, dem Einfluss von Herbivoren, in einigen Pflanzen nach der Rekrutierung dieser Genkopie der erste Schritt zur Biosynthese von Abwehrstoffen etabliert werden. In der Literatur lassen sich mehrere Beispiele dafür finden, dass Gene zwecks einer einzigen Funktion aus Genfamilien unabhängig rekrutiert wurden. So wird von SCOTT und WEN (2001) und von WILSON (2001) angenommen, dass die Resistenz von Insekten gegenüber bestimmten Toxinen auf der unabhängigen Rekrutierung paraloger Gene basiert, die zur Cytochrom P450 Familie gehören. Und auch anhand pflanzlicher Terpensynthesen wie der Limonensynthase konnte BOHLMANN *et al.* (1998) innerhalb dieser Genfamilie zeigen, dass diese mehrmals aus anderen Terpensynthesen rekrutiert worden sind. Bezogen auf die HSS hingegen sieht die Situation ein wenig anders aus. Hier sind die mehrmaligen Rekrutierungen nicht auf eine Genfamilie zurückzuführen, da es sich im Falle der DHS um ein „single-copy“ Gen handelt, was alle bisher abgeschlossenen eukaryontischen Genomprojekte zweifelsfrei gezeigt haben. Je umfangreicher eine Genfamilie innerhalb eines Genomes ist, desto mehr Gene stehen für mögliche neue Genduplikationen zur Verfügung. Es ist aus diesem Grunde sehr bemerkenswert, dass gerade das „single-copy“ Gen der DHS der Ursprung mehrmaliger Genduplikationen ist. Einige dieser Genduplikationen sind unabhängig voneinander in unterschiedlichen Pflanzenfamilien (Boraginaceae, Asteraceae, Orchidaceae) sicher bestätigt, in denen sie das erste stoffwechselspezifische Enzym der PA-Biosynthese codieren.

Bis heute konnte keine HSS aus Pflanzen identifiziert werden, die keine PA-Biosynthese aufweisen. Dies bestätigt die anfängliche Vorgehensweise nur in PA-haltigen Pflanzen nach HSS-codierenden cDNAs zu suchen. Aber in allen anderen Pflanzen finden wir das von der DHS, einem essentiellen Enzym des Primärstoffwechsels, in ihrer Nebenaktivität synthetisierte Nebenprodukt Homospermidin wieder. Somit könnte auch in einer dieser Pflanzen die Möglichkeit gegeben sein, dort eine HSS zu finden, obwohl die von der DHS produzierten Gehalte an Homospermidin sehr gering sind (OBER *et al.*, 2003b). Die permanente Verfügbarkeit von Homospermidin, dem Grundkörper aller Necinbasen in PAs, könnte jedoch die Voraussetzung für die wiederholte Etablierung dieses Stoffwechselweges während der Angiospermenevolution gewesen sein. Erhöhte Homospermidingehalte konnten bisher nur in einigen wenigen Pflanzen festgestellt werden, somit einer der Gründe warum es als ein seltenes Polyamin angesehen wird (KUEHN *et al.*, 1990; HAMANA *et al.*, 1992, 1994). An den Ursachen, welche Enzyme in diesen Pflanzen verantwortlich für diese hohen Gehalte an Homospermidin sind, wird bereits geforscht.

#### 4.1.3 Transkriptionsorte in den untersuchten Pflanzen

Die cDNA-Sequenzen, die für ein DHS- oder ein HSS-Protein in den hier analysierten Boraginaceae (*C. officinale*, *H. indicum* und *S. officinale*) und Asteraceae (*P. hybridus*) codieren, wurden durch biochemische Charakterisierung eindeutig identifiziert. Anschließend wurden mit den entsprechenden Expressionsprimern die gesamten Pflanzen nach Transkriptionsorten gescreent. Aus diesen Ergebnissen sollten weitere Versuche wie Western-Blot Analysen und anschließende Immunolokalisationen für die zu untersuchenden Boraginaceae abgeleitet werden (NIEMÜLLER, 2007).

Im Unterschied zu den bislang biochemisch untersuchten PA-produzierenden Pflanzen der Familie der Asteraceae (*Senecio* und *Eupatorium*), wo PAs ausschließlich in den Wurzeln synthetisiert werden (HARTMANN und WITTE, 1995) und die molekularbiologischen Untersuchungen mit dem Nachweis der HSS in den Wurzelgeweben dieser Pflanzen (ANKE *et al.*, 2004; MOYLL *et al.*, 2002), konnten radiobiochemische Untersuchungen an *Cynoglossum officinale* (Keimlinge und einjährige Rosettenpflanzen) sowohl den Spross, als auch die Wurzeln als PA-Biosyntheseorte identifizieren (FRÖLICH, 1996; VAN DAM *et al.*, 1995; Tab. 4.1). So zeigten auch molekularbiologische Untersuchungen über den Nachweis der HSS an *Phalaenopsis*, dass sowohl die Knospe als auch die Luftwurzelspitze möglicherweise zur PA-Biosynthese in der Lage sind (ANKE, 2004; NURHAYATI, 2004). Bei der hier untersuchten Boraginaceae *C. officinale* konnte ebenfalls die Transkription der HSS in der Wurzel und in



oberirdischen Organen und Geweben (Keimlinge, einjährige Rosettenpflanze und Pflanze im zweiten Entwicklungsjahr) nachgewiesen werden, was somit die Ergebnisse der früheren radiobiochemischen Untersuchungen an dieser Pflanze unterstützt (Tab. 4.1). Die durchgeführten Western-Blot Analysen des Vegetationskegels verschieden alter Keimlinge dieser Pflanze konnten ebenfalls die Expression der HSS in diesen jungen Geweben zeigen. Es könnte jedoch sein, dass aufgrund der Präparationstechnik keine exakte Trennung von Wurzel- und Sprossgewebe stattgefunden hat, und die Reste des Wurzelgewebes dieses positive Signal verursachten. Genauere immunohistologische Untersuchungen wären also zu einer exakten Beurteilung dieser Ergebnisse notwendig, um genau zu klären, wo die Expression des HSS-Proteins stattfindet, was Gegenstand parallel durchgeführter Arbeiten ist. Expressionsanalysen im Rahmen dieser Arbeit konnten hingegen an *Cynoglossum* Pflanzen (einjährige Rosettenpflanze und Pflanze im zweiten Entwicklungsjahr) keinen Hinweis auf die Expression des HSS-Proteins in den oberirdischen Organen liefern, nur die jeweils jungen Wurzeln waren, wie schon ANKE (2004) an *Eupatorium cannabinum* und MOLL (2002) an *Senecio vernalis* zeigen konnten, in der Lage die HSS zu exprimieren.

Bei der Boraginaceae *H. indicum* konnten die Ergebnisse der früheren radiobiochemischen Untersuchungen durch die Transkriptionsanalysen der HSS unterstützt werden (Tab.4.1). Wie schon von FRÖLICH (1996) gezeigt wurde, findet die PA-Biosynthese innerhalb dieser Pflanze ausschließlich in den oberirdischen Organen statt. Entsprechende Transkripte für die HSS cDNA konnten hier sowohl in allen untersuchten oberirdischen Organen, als auch in der jungen Wurzel dieser Pflanze identifiziert werden. Auch FRÖLICH (2007) konnte in ihren radiobiochemischen Versuchen dieses mögliche Vorhandensein einer HSS in den Wurzeln von *H. indicum* durch die Synthese von Homospermidin bestätigen. Parallel am Institut durchgeführte Expressionsanalysen auf Proteinebene durch vergleichende Western-Blots konnten die Ergebnisse der Transkriptionsanalysen nicht vollständig bestätigen (Tab.4.1).

Tab. 4.1: Vergleich der gewebespezifischen Transkriptions- und Expressionsanalysen der HSS in den untersuchten Pflanzen mit den Ergebnissen früherer biochemischer Untersuchungen zur PA-Biosynthese

Pflanze	Ergebnisse der biochemischen Tracerexperimente	Ergebnisse der Transkriptionsanalysen	Ergebnisse der Expressionsanalysen
<i>Cynoglossum officinale</i>	PA-Biosynthese sowohl in <b>isolierten Sprossen</b> als auch in <b>isolierten Wurzeln</b> nachgewiesen (VAN DAM <i>et al.</i> , 1995)	HSS-Transkripte konnten sowohl in den <b>oberirdischen Organen</b> wie <b>Blatt</b> , <b>Stängel</b> und <b>Knospe</b> , als auch in den <b>jungen Wurzeln</b> gefunden werden	Proteinexpression der HSS konnte nur in den <b>Wurzeln</b> nachgewiesen werden (NIEMÜLLER, 2007) Im <b>Sprossapikalmeristem</b> von Keimlingen konnten nur <b>sehr schwache</b> Proteinbanden detektiert werden
<i>Heliotropium indicum</i>	PA-Biosynthese <b>nur in oberirdischen Organen</b> , vor allem in den jungen Blättern (FRÖLICH, 1996) In den <b>Wurzeln</b> nur die Biosynthese bis zum <b>Homospermidin</b> nachgewiesen (FRÖLICH, 1996)	HSS-Transkripte konnten in <b>allen</b> untersuchten <b>Gewebe</b> n gefunden werden, wobei das Signal in der Wurzel am schwächsten war	Proteinexpression der HSS <b>nur in oberirdischen Organen</b> wie Spross, Blatt und Knospe (NIEMÜLLER, 2007)
<i>Symphytum officinale</i>	PA-Biosynthese <b>ausschließlich</b> in der <b>Wurzel</b> (FRÖLICH, 1996)	HSS-Transkripte konnten in den <b>Wurzeln</b> gefunden werden <b>erstmalig</b> wurden Transkripte auch in <b>oberirdischen Organen</b> wie Blättern, Knospe und Blüte nachgewiesen, wobei die Signale in den <b>Blättern am stärksten</b> waren	Proteinexpression der HSS in den <b>Wurzeln</b> <b>erstmalig</b> wurde HSS-Expression aber auch in den <b>Blättern</b> nachgewiesen
<i>Petasites hybridus</i>	Keine Daten bekannt	HSS-Transkripte konnten nur in den <b>Wurzeln</b> gefunden werden	Keine Daten bekannt

In diesen Western-Blots konnte das HSS-Protein nur in den jungen Blättern, im jungen Stängel und in der Knospe nachgewiesen werden (NIEMÜLLER, 2007). Dies könnte z.B. Beispiel am nicht identischen Probenmaterial liegen, da das Pflanzenmaterial zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht wurde. Dass der Zeitpunkt der Probennahme einen Einfluss auf die Versuchsergebnisse haben kann, konnte schon von ANKE (2004) für den Nachweis des HSS-Proteins in der mehrjährigen Staude *E. cannabinum* gezeigt werden. Auch NIEMÜLLER (2007) konnte an unterschiedlich alten Blättern von *H. indicum* zeigen, dass die Expression der HSS abhängig von Alter und Entwicklungszustand der Organe ist. Konnte in den jüngsten Blättern (bis 2 cm Länge) die stärkste Expression festgestellt werden, so nahm diese kontinuierlich mit zunehmender Blattlänge und Blattalter ab, bis in 6 cm langen Blättern gar keine Expression mehr detektierbar war (NIEMÜLLER, 2007). Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von FRÖLICH (1996), die in Fütterungsversuchen mit radioaktiv markiertem Putrescin den stärksten Einbau in PAs in den jungen Blättern dieser Pflanze nachgewiesen hat (Tab. 4.1).

Die früheren biochemischen Analysen an *Symphytum officinale* zeigten, dass die PA-Biosynthese ausschließlich in den Wurzeln stattfindet (FRÖLICH, 1996). Auch in isolierten Sprosskulturen ohne Wurzeln und in Kalluskulturen konnten keine PAs nachgewiesen werden (BABUCKE, unveröffentlicht; HUIZING, 1983). Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten RT-PCRs konnten ebenfalls die Wurzeln als Transkriptionsorte der HSS identifiziert werden. Darüberhinaus konnten HSS-Transkripte erstmalig in oberirdischen Organen, vor allem in den Blättern, detektiert werden. Diese positiven Signale konnten in gemeinsam mit Niemüller durchgeführten Western-Blots auf Proteinebene an jungen endständigen Blättern eines nur Knospen tragenden Seitentriebes bestätigt werden (Tab. 4.1). Interessanterweise konnte nach dem Erblühen der Knospen sowie an endständigen jungen Blättern von Seitentrieben ohne jegliche Blütenanlagen kein HSS-Protein im Immunoblot mehr nachgewiesen werden. Diese den Knospen der Pflanze nahe liegenden Blätter, könnten somit über kurze Entfernung PAs zum Schutz der Fortpflanzungsorgane liefern. So konnte ANKE (2004) in Untersuchungen zur gewebespezifischen Lokalisation an *E. cannabinum* feststellen, dass während des Knospenstadiums dieser Pflanze die stärkste Expression des HSS-Proteins in den Wurzeln erfolgte. Nach dem Erblühen der Knospen nahm die Expression deutlich ab, bis sie im Fruchtstadium der Pflanze in den Wurzeln nicht mehr detektierbar war. Neben dem Nachweis des HSS-Transkriptes und des HSS-Proteins in den beschriebenen Blättern von *S. officinale* konnte durch erste Fütterungsversuche mit radioaktiv markiertem [ $^{14}\text{C}$ ]Putrescin Retro-necin als Necinbasengrundkörper nachgewiesen werden. Somit ergeben sich erstmals Hinweise darauf, dass auch in den Blättern von *S. officinale* eine PA-Biosynthese stattfinden könnte.

Sicherlich sind weitere Fütterungsexperimente notwendig um diese Hinweise zu bestätigen. Weiterhin sollte auch das Alkaloidspektrum der Blätter von *S. officinale* erfasst werden, um mögliche Unterschiede zu den in den Wurzeln vorkommenden Alkaloiden aufzuzeigen.

Neben den bereits erwähnten Vertretern der Boraginaceae wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig auch die Asteraceae *Petasites hybridus* (Tribus Senecioneae) hinsichtlich ihrer HSS-Transkriptionsorte mittels RT-PCR untersucht. Wie schon für die Asteraceae *E. cannabinum* und *Senecio vernalis* gezeigt wurde (ANKE *et al.*, 2004; MOLL *et al.*, 2002), konnte auch für *P. hybridus* die Wurzel als exklusives Transkriptionsorgan der HSS identifiziert werden. Somit scheint die PA-Biosynthese innerhalb der Asteraceae ausschließlich auf die Wurzeln beschränkt zu sein. Obwohl die HSS innerhalb der bereits analysierten Asteraceae einheitlich spezifisch in den Wurzeln exprimiert wird, zeigten frühere Untersuchungen zur Immunolokalisation auf zellulärer Ebene unterschiedliche Expressionsmuster. Während in *S. vernalis* und *S. jacobaea* (Tribus Senecioneae) die HSS in Zellverbänden aus Endodermis und dem angrenzenden Rindenparenchym exprimiert wird (MOLL *et al.*, 2002; NIEMÜLLER, 2007), konnte die HSS in *E. cannabinum* (Tribus Eupatorieae) nur im Rindenparenchym von jungen weißen, jährlich neu austreibenden Wurzeln lokalisiert werden (ANKE *et al.*, 2004). Für weitere Untersuchungen wäre es interessant, für *P. hybridus*, die Transkription auf Proteinebene zu bestätigen sowie darüber hinaus die gewebespezifische Expression auf zellulärer Ebene zu untersuchen. Zu erwarten wäre eine ähnliche Lokalisation der HSS wie sie schon für *Senecio* gezeigt wurde, da *Petasites* ebenfalls zum Tribus der Senecioneae gehört. Auch durch die Untersuchungen der HSS auf genomischer Ebene hinsichtlich ihrer Exon-Intron-Struktur wird diese Vermutung gestärkt, da alle analysierten Senecioneae nur 5 Introns besitzen, alle Eupatorieae hingegen 6 Introns aufweisen.

#### 4.1.4 Einschätzung der bioinformatischen Promotoranalyse

Die Transkriptionsanalyse (4.1.3) hat gezeigt, dass die DHS als ein Enzym des Primärstoffwechsels ubiquitär und die HSS als das Eingangsenzym der PA-Biosynthese im Sekundärstoffwechsel gewebespezifisch exprimiert wird. In den phylogenetischen Untersuchungen wurde gezeigt, dass die HSS aus der DHS während der Angiospermenevolution in der Familie der Boraginaceae nur einmal unabhängig rekrutiert wurde und somit monophyletischen Ursprungs ist. Daher lag es nahe, nach konservierten Elementen transkriptioneller Regulation zu suchen. Um Gemeinsamkeiten oder spezifische Unterschiede in den regulatorischen putativen Promotorsequenzen der DHS- und HSS-codierenden Gene zu finden, wurden deren Sequenzen bioinformatisch analysiert.

Es ließen sich keine bekannten Transkriptionsfaktorbindestellen (TFBs) in den hier untersuchten Promotoren nachweisen, die auf gemeinsame Regulationsmechanismen hingewiesen hätten. Anzumerken ist dabei, dass für etwa 1200 annotierte Transkriptionsfaktoren aus *Arabidopsis* nur in ungefähr 50 Fällen TFBs beschrieben sind (ROMERO *et al.*, 1998). Daher ist diese Untersuchung bei Weitem nicht vollständig. Aus diesem Grund wurde nach konservierten Sequenzmotiven innerhalb der Promotoren gesucht um möglicherweise charakteristische Motive zu finden. Dabei wurden weder evolutionär konservierte Motive, die sowohl bei DHS- als auch bei HSS-Promotoren auftreten, gefunden, noch konnten charakteristische Motive für eine der beiden Gruppen identifiziert werden. Letztere hätten eventuell einen ersten Hinweis für die gewebespezifischen transkriptionellen Regulationsmechanismen liefern können. Insgesamt weisen die Promotorregionen der untersuchten Gene ein wesentlich geringeres Maß an Sequenzhomologie auf, als deren phylogenetisch analysierte cDNA-Sequenzen, was eine derartige Untersuchung zusätzlich erschwert. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Promotoren in der Gesamtheit ihrer Sequenz grundsätzlich einem geringeren Selektionsdruck unterliegen. Selbst wenn in den Promotorsequenzen eine gemeinsame charakteristische TFB gefunden worden wäre, hätte diese experimentell überprüft werden müssen. Idealerweise wäre es nötig, dazu das zum *Arabidopsis* Transkriptionsfaktor orthologe Gen aus den entsprechenden Pflanzen zu identifizieren, zu isolieren und rekombinant zu synthetisieren. Damit könnte dann zumindest *in vitro* Bindungsaktivität an das gefundene *cis*-Element nachgewiesen werden. Für einen *in vivo* Nachweis wäre es notwendig, transgene Pflanzen zu regenerieren, die modifizierte Expressionslevel des entsprechenden Transkriptionsfaktors aufweisen.

#### 4.1.5 Ausblick

Die phylogenetischen Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, zeigten, dass die HSS innerhalb der Boraginaceae monophyletischen Ursprungs und innerhalb der Familie der Asteraceae polyphyletischen Ursprungs ist (REIMANN *et al.*, 2004). Gerade vor dem Hintergrund, dass die HSS innerhalb der hier untersuchten Boraginaceae nur einmal aus der DHS entstanden ist, ist es bemerkenswert, dass sich die Expressionsmuster zwischen den hier untersuchten Arten sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene unterscheiden. Daher scheint es unerlässlich zu sein, die bioinformatischen Promotoranalysen um experimentelle Systeme wie z.B. transgene Versuchsansätze (Promotor::*GUS*) zu ergänzen. Solche Versuche liefern somit zusätzliche Informationen zur Regulationsebene der HSS. Eventuell wäre es sogar möglich die für die transkriptionelle Regulation entscheidenden *cis*-Elemente durch

Deletionsanalysen der Promotoren zu identifizieren. Möglicherweise könnten auch die daran beteiligten Transkriptionsfaktoren bestimmt werden.

Die zur Erstellung des phylogenetischen Baumes zu Grunde liegende Systematik der Boraginaceae stellte die untersuchten Arten in einen engen verwandtschaftlichen Zusammenhang. Neuere cladistische Untersuchungen auf Basis von *trnL* (Chloroplasten-DNA) und ITS1 (Kern-DNA) stellen die Arten jedoch als nur entfernt verwandt dar (BÖHLE und HILGER, 1997; DIANE *et al.*, 2002; HILGER *et al.*, 2004). So wird *Heliotropium* nicht mehr zur Familie der Boraginaceae gezählt, sondern in die eigenständige Familie der Heliotropiaceae eingeordnet. Daher erscheint es notwendig die phylogenetischen Daten mit den jeweils gültigen systematischen Einteilungen abzugleichen und gegebenenfalls um weitere Pflanzenarten zu ergänzen.

Da die Ranunculaceae gemeinhin als phylogenetisch ursprünglich angesehen werden, ist es angeraten die PA-synthetisierenden Arten *Caltha biflora* und *C. leptosepala* (HARTMANN und WITTE, 1995) in die Analyse zum evolutionären Ursprung der HSS mit einzubeziehen.

Zum ersten Mal gibt es deutliche Hinweise darauf, dass auch in den Blättern von *S. officinale* PAs synthetisiert werden. Diese radioaktiven Fütterungsversuche sollten verifiziert werden, um anschließend über HPLC-MS-Maldi-TOF-Analysen PAs und ihre Derivate eindeutig nachzuweisen.

Da mit der HSS erst das Eingangsenzym der PA-Biosynthese phylogenetisch untersucht ist, erscheint es ratsam neben den bereits laufenden Untersuchungen zur Diaminoxidase (Ringschluss der Necinbase) und Acetolactatsynthase (Bildung der Necinsäure, Lycopsamintyp-PAs) auch noch weitere an der PA-Biosynthese beteiligte Enzyme zu identifizieren und zu charakterisieren.

Bislang ist noch nicht abschließend geklärt welche Mutationen in einer DHS zum Verlust der DHS-Aktivität führen und damit die DHS in eine HSS umwandeln.

## 5. Zusammenfassung

Um die Frage nach dem Ursprung der PA-Biosynthese zu beantworten wurden aus der bislang noch nicht untersuchten Familie der Boraginaceae mit den Vertretern *Cynoglossum officinale*, *Heliotropium indicum* und *Symphytum officinale* HSS- und DHS- codierende cDNAs isoliert, kloniert, sequenziert, biochemisch identifiziert und für die phylogenetische Analyse zur Verfügung gestellt. Um die phylogenetischen Analysen innerhalb der Familie der Asteraceae zu ergänzen wurde als zusätzlicher Vertreter des Tribus Senecioneae die Gattung *Petastites* (*P. hybridus*) mit in die Untersuchungen einbezogen. Darüber hinaus wurden die genomischen „full-length“-Sequenzen der oben aufgeführten Arten zuzüglich *E. cannabinum* und über Inverse PCR die Sequenzen der HSS-Promotoren der Boraginaceae ermittelt.

Die Untersuchungen ergaben:

Die HSS ist innerhalb der Boraginaceae monophyletischen Ursprungs.

Innerhalb der Asteraceae ist die HSS aus der DHS mindestens zweimal unabhängig entstanden und somit polyphyletischen Ursprungs.

Die Analyse der Exon-Intron-Strukturen aller hier untersuchter HSS- und DHS-codierender Sequenzen ergab weder eine Bestätigung noch einen Widerspruch zu der Darstellung des phylogenetischen Baumes.

Es ergaben sich in den analysierten Arten keine Hinweise auf die Existenz von Pseudogenen.

Während bei dem Tribus Senecioneae der Asteraceae die DHS sechs Introns, die HSS aber nur fünf Introns aufweist (letztes Intron fehlt), wurden bei allen anderen Pflanzenarten bislang sowohl für die DHS als auch für die HSS sechs Introns ermittelt. In allen Fällen bleiben Position und Phase der Introns erhalten.

Die Ergebnisse der biochemischen Tracerexperimente aus früheren Arbeiten an den hier untersuchten Boraginaceae wurden durch die Transkriptionsanalysen weitestgehend bestätigt.

Erstmalig konnte durch radioaktive Fütterungsversuche gezeigt werden, dass auch in den Blättern von *Symphytum officinale* die PA-Biosynthese möglich ist.

Eine rein bioinformatische Promotoranalyse erbrachte keine Hinweise auf gemeinsame oder unterschiedliche Transkriptionsmechanismen.



## 6. Literaturverzeichnis

- Anke, S.** (2004). Molekularbiologische und immunologische Untersuchungen zur gewebe- und zellspezifischen Lokalisation der Homospermidin-Synthase, des Eingangsenzyms der Pyrrolizidin-Alkaloid-Biosynthese, in *Eupatorium cannabinum* (Asteraceae) und *Phalaenopsis* Species (Orchidaceae) (Dissertation, TU Braunschweig).
- Anke, S., Niemüller, D., Moll, S., Hansch, R. und Ober, D.** (2004). Polyphyletic origin of pyrrolizidine alkaloids within the Asteraceae. Evidence from differential tissue expression of homospermidine synthase. *Plant Physiology* **136**, 4037-4047.
- Axelsen, K.B. und Palmgren, M.G.** (1998). Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *Journal of Molecular Evolution* **46**, 84-101.
- Bartig, D., Lemkemeier, K., Frank, J., Lottspeich, F. und Klink, F.** (1992). The archaeobacterial hypusine-containing protein. Structural features suggest common ancestry with eukaryotic translation initiation factor 5A. *European Journal of Biochemistry*, pp. 751-758.
- Bayer, R.J. und Starr, J.R.** (1998). Tribal phylogeny of the Asteraceae based on two non-coding chloroplast sequences, the *trnL* intron and *trnL/trnF* intergenic spacer. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **85**, 242-256.
- Biller, A., Boppré, M., Witte, L. und Hartmann, T.** (1994). Pyrrolizidine alkaloids in *Chromolaena odorata*: chemical and chemoeological aspects. *Phytochemistry* **35**, 615-619.
- Birecka, H. und Catalfamo, J.L.** (1982). Incorporation of assimilated carbon into aminoalcohols of *Heliotropium spathulatum*. *Phytochemistry* **21**, 2645-2651.
- Böhle, U.-R. und Hilger, H.H.** (1997). Chloroplast DNA systematics of "Boraginaceae" and related families - a goodbye to the old and familiar concept of five subfamilies. *Scripta Botanica Belgica* **15**, 30.

- Bohlmann, J., Meyer-Gauen, G. und Croteau, R.** (1998). Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **95**, 4126-4133.
- Boppré, M.** (1995). Pharmakophagie: Drogen, Sex und Schmetterlinge. *Biologie in unserer Zeit* **25**, 8-17.
- Böttcher, F., Adolph, R.D. und Hartmann, T.** (1993). Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme in pyrrolizidine alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry* **32**, 679-689.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Brown, K.S. und Trigo, J.R.** (1995). The ecological activity of alkaloids. In *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*, G.A. Cordell, ed (New York: Academic Press), pp. 227-356.
- Cheeke, P.R.** (1988). Toxicity and metabolism of pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Animal Science* **66**, 2343-2350.
- Clarke, J.M.** (1988). Novel-nontemplated nucleotide addition reaction catalyzed by prokaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Research* **16**, 9677-9686.
- Cohen, S.N., Chang, A.C. und Hsu, L.** (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **69**, 2110-2114.
- Diane, N., Förther, H. und Hilger, H.H.** (2002). A systematic analysis of *Heliotropium*, *Tournefortia*, and allied taxa of the Heliotropiaceae (Boraginales) base on ITS1 sequences and morphological data. *American Journal of Botany* **89**(2), 287-295.

- Don, R.H., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Baker, K. und Mattick, J.S.** (1991). 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research* **19**, 4008.
- Ehmke, A., von Borstel, K. und Hartmann, T.** (1988). Alkaloid *N*-oxides as transport and vacuolar storage compounds of pyrrolizidine alkaloids in *Senecio vulgaris* L. *Planta* **176**, 83-90.
- Eisner, T. und Meinwald, J.** (1995). The chemistry of sexual selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 50-55.
- Esnault, C., Maestre, J. und Heidmann, T.** (2000). Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes. *Nature Genetics* **24**, 363-367.
- Frölich, C.** (1996). Vorkommen, Verteilung und Biosynthese von Pyrrolizidinalkaloiden in Boraginaceae und Orchidaceae (Dissertation, TU Braunschweig).
- Frölich, C., Ober, D. und Hartmann, T.** (2007). Tissue distribution, core biosynthesis and diversification of pyrrolizidine alkaloids of the lycopsamine type in the three Boraginaceae species. *Phytochemistry* **68**, 1026-1037.
- Gordon, E.D., Mora, R., Meredith, S.C., Lee, C. und Lindquist, S.L.** (1987). Eukaryotic initiation factor 4D, the hypusine-containing protein, is conserved among eukaryotes. *Journal of Biological Chemistry* **262**, 16585-16589.
- Graser, G. und Hartmann, T.** (2000). Biosynthesis of spermidine, a direct precursor of pyrrolizidine alkaloids in root cultures of *Senecio vulgaris* L. *Planta* **211**, 239-245.
- Hamana, K., Matsuzaki, S., Niitsu, M. und Samejima, K.** (1992). Distribution of unusual polyamines in leguminous seeds. *Canadian Journal of Botany* **70**, 1984-1990.
- Hamana, K., Matsuzaki, S., Niitsu, M. und Samejima, K.** (1994). Distribution of unusual polyamines in aquatic plants and gramineous seeds. *Canadian Journal of Botany* **72**, 1114-1120.

- Hancock, K. und Tsang, V.C.W.** (1983). Indian ink staining of proteins on nitrocellulose paper. *Analytical Biochemistry* **133**, 157-162.
- Harborne, J.B.** (1993). *Introduction to Ecological Biochemistry*. (San Diego, London: Academic Press).
- Harborne, J.B.** (2001). Twenty-five years of chemical ecology. *Natural Product Reports* **18**, 361-379.
- Hartmann, T.** (1985). Warum gibt es so viele Arzneipflanzen? Zur Rolle des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels. *Deutsche Apotheker Zeitung* **127**, 2523-2527.
- Hartmann, T.** (1994). *Senecio* ssp.: Biochemistry of the formation of pyrrolizidine alkaloids in root cultures. In *Medicinal and Aromatic Plants*, Y.P.S. Bajaj, ed (Berlin, Heidelberg: Springer), pp. 339-355.
- Hartmann, T.** (1996). Diversity and variability of plant secondary metabolism: A mechanistic view. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **80**, 177-188.
- Hartmann, T.** (1999). Chemical ecology of pyrrolizidine alkaloids. *Planta* **207**, 483-495.
- Hartmann, T. und Zimmer, M.** (1986). Organ-specific distribution and accumulation of pyrrolizidine alkaloids during the life history of two annual *Senecio* species. *Journal of Plant Physiology* **122**, 67-80.
- Hartmann, T. und Toppel, G.** (1987). Senecionine *N*-oxide, the primary product of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis in root cultures of *Senecio vulgaris*. *Phytochemistry* **26**, 1639-1644.
- Hartmann, T. und Witte, L.** (1995). Chemistry, biology and chemoeology of the pyrrolizidine alkaloids. In *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*, S.W. Pelletier, ed (Oxford: Pergamon Press), pp. 155-233.

- Hartmann, T. und Ober, D.** (2000). Biosynthesis and metabolism of pyrrolizidine alkaloids in plants and specialized insect herbivores. In Topics in Current Chemistry (Berlin, Heidelberg: Springer), pp. 207-243.
- Hartmann, T., Sander, H., Adolph, R.D. und Toppel, G.** (1988). Metabolic links between the biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids and polyamines in root cultures of *Senecio vulgaris*. *Planta* **175**, 82-90.
- Hartmann, T., Theuring, C., Witte, L. und Pasteels, J.M.** (2001). Sequestration, metabolism and partial synthesis of tertiary pyrrolizidine alkaloids by the neotropical leaf-beetle *Platyphora boucardi*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **31**, 1041-1056.
- Hartmann, T., Ehmke, A., Eilert, U., von Borstel, K. und Theuring, C.** (1989). Sites of synthesis, translocation and accumulation of pyrrolizidine alkaloid *N*-oxides in *Senecio vulgaris* L. *Planta* **177**, 98-107.
- Hartmann, T., Theuring, C., Schmidt, J., Rahier, M. und Pasteels, J.M.** (1999). Biochemical strategy of sequestration of pyrrolizidine alkaloids by adult and larvae of chrysomelid leaf beetles. *Journal of Insect Physiology* **45**, 1085-1095.
- Hartmann, T., Witte, L., Ehmke, A., Theuring, C., Rowell-Rahier, M. und Pasteels, J.M.** (1997). Selective sequestration and metabolism of plant derived pyrrolizidine alkaloids by chrysomelid leaf beetles. *Phytochemistry* **45**, 489-497.
- Haslam, E.** (1986). Secondary Metabolism - facts and fiction. *Natural Product Reports* **3**, 217-249.
- Hertz, G.Z. und Stormo, G.D.** (1999). Identifying DNA and protein patterns with statistically significant alignments of multiple sequences. *Bioinformatics* **15**, 563-577.
- Hilger, H.H., Selvi, F., Papini, A. und Bigazzi, M.** (2004). Molecular systematics of Boraginaceae tribe Boragineae based on ITS1 and trnL sequences, with special reference to *Anchusa* s.l. *Annals of Botany (Lond)* **94**, 201-212.

- Hochuli, E., Dobeli, H. und Schacher, A.** (1987). New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *Journal of Chromatography* **411**, 177-184.
- Hughes, A.L.** (1994). The evolution of functionally novel proteins after gene duplication. *Proceedings Biological Science* **256**, 119-124.
- Hughes, M.K. und Hughes, A.L.** (1993). Evolution of duplicate genes in a tetraploid animal, *Xenopus laevis*. *Molecular Biology and Evolution* **10**, 1360-1369.
- Huizing, H.J., Pfauth, E.C., Malingre, T.M. und Sietsma, J.H.** (1983). Regeneration of plants from tissue- and cell suspension cultures of *Symphytum officinale* L. and effect of in vitro culture on pyrrolizidine alkaloid production. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **2**, 227-238.
- Jansen, R.K. und Kim, K.J.** (1996). Implications of chloroplast DNA data for the classification and phylogeny of the asteraceae. In *Compositae: Systematics. Proceedings of the International Compositae Conference, Kew 1994*, D.J.N.H.a.H. Beentje, ed (Kew: Royal Botanic Gardens), pp. 317-339.
- Jenett-Siems, K., T., S., Kaloga, M., Eich, E., Siems, K., Gupta, M.P., Witte, L. und Hartmann, T.** (1998). Phytochemistry and chemotaxonomy of the Convolvulaceae: Pyrrolizidine alkaloids of *Ipomoea hederifolia* and related species. *Phytochemistry* **47**, 1551-1560.
- Kang, K.R., Wolff, E.C., Park, M.H., Folk, J.E. und Chung, S.I.** (1995). Identification of YHR068w in *Saccharomyces cerevisiae* chromosome VIII as a gene for deoxyhypusine synthase. Expression and characterization of the enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 18408-18412.
- Khan, H.A. und Robbins, D.J.** (1985). Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis of <sup>14</sup>C-labelled homospermidines and their incorporation into retronecine. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry*, 819-824.

- Kim, K.J. und Jansen, R.K.** (1995). *ndhF* sequence evolution and the major clades in the sunflower family. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **92**, 10379-10383.
- Kondrashov, F.A., Rogozin, I.B., Wolf, Y.I. und Koonin, E.V.** (2002). Selection in the evolution of gene duplications. *Genome Biology* **3**, RESEARCH0008.
- Kuehn D. G., R.-G., B., Bagga, S., and Phillips, G.C.** (1990). Novel Occurrence of Uncommon Polyamines in Higher Plants. *Plant Physiology* **94**, 855 - 857.
- Li, W.-H.** (1985). Accelerated evolution following gene duplication and its implication for the neutralist-selectionist controversy. In *Population Genetics and Molecular Evolution*, T. Ohta und K. Aoki (Berlin: Springer-Verlag), pp. 333-352.
- Li, W.-H.** (1997). *Molecular Evolution* (Sunderland, MA: Sinauer Associates).
- Lindigkeit, R., Biller, A., Buch, M., Schiebel, H.M., Boppré, M. und Hartmann, T.** (1997). The two faces of pyrrolizidine alkaloids: The role of the tertiary amine and its *N*-oxide in chemical defense of insects with acquired plant alkaloids. *European Journal of Biochemistry* **245**, 626-636.
- Luckner, M.** (1990). *Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants and Animals*. (Jena: Gustav Fischer).
- Magdolen, V., Klier, H., Wohl, T., Klink, F., Hirt, H., Hauber, J. und Lottspeich, F.** (1994). The function of the hypusine-containing proteins of yeast and other eukaryotes is well conserved. *Molecular Genetics and Genomics* **244**, 646-652.
- Mattocks, A.R.** (1986). *Chemistry and Toxicology of Pyrrolizidine Alkoids*. (London, New York: Academic Press).
- Miranda, C.L., Chung, W., Reed, R.E., Zhao, X., Henderson, M.C., Wang, J.L., Williams, D.E. und Buhler, D.R.** (1991). Flavin-containing monooxygenase: A major

detoxifying enzyme for the pyrrolizidine alkaloid senecionine in guinea pig tissues. Biochemical and Biophysical Research Communications **178**, 546-552.

**Moll, S., Anke, S., Kahmann, U., Hansch, R., Hartmann, T. und Ober, D.** (2002). Cell-specific expression of homospermidine synthase, the entry enzyme of the pyrrolizidine alkaloid pathway in *Senecio vernalis*, in comparison with its ancestor, deoxyhypusine synthase. Plant Physiology **130**, 47-57.

**Mothes, K.** (1955). Physiology of alkaloids. Annual Review of Plant Physiology **6**, 393-432.

**Murashige, T. und Skoog, F.** (1962). Medium for growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum **15**, 473-497.

**Naumann, C., Hartmann, T. und Ober, D.** (2002). Evolutionary recruitment of a flavin-dependent monooxygenase for the detoxification of host plant-acquired pyrrolizidine alkaloids in the alkaloid-defended arctiid moth *Tyria jacobaeae*. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America **99**, 6085-6090.

**Niemüller, D.** (2007). Vergleichende Lokalisation der Homospermidinsynthase, Eingangsenzym der Pyrrolizidin-Alkaloid-Biosynthese, in verschiedenen Vertretern der Boraginaceae (Dissertation, TU Braunschweig).

**Nowacki, E. und Byerrum, R.U.** (1962). A study on the biosynthesis of the *Crotalaria* alkaloids. Life Sciences **5**, 157-161.

**Nurhayati, N. und Ober, D.** (2005). Recruitment of alkaloid-specific homospermidine synthase (HSS) from ubiquitous deoxyhypusine synthase: Does *Crotalaria* possess a functional HSS that still has DHS activity? Phytochemistry **66**, 1346-1357.

**Nurhayati, N.N.** (2004). Identification, Molecular Cloning and Characterisation of Homospermidine Synthase and Deoxyhypusine Synthase from *Phalaenopsis* and *Crotalaria* Species (Dissertation, TU Braunschweig).



- Ober, D.** (1997). Strategien zur immunologischen und molekularbiologischen Untersuchung der Homospermidin-Synthase, dem Eingangsenzym der Pyrrolizidinalkaloid-Biosynthese (Dissertation, TU Braunschweig).
- Ober, D. und Hartmann, T.** (1999a). Deoxyhypusine synthase from tobacco. cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of an enzyme with extended substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 32040-32047.
- Ober, D. und Hartmann, T.** (1999b). Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolved from deoxyhypusine synthase. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **96**, 14777-14782.
- Ober, D. und Hartmann, T.** (2000). Phylogenetic origin of a secondary pathway: the case of pyrrolizidine alkaloids. *Plant Molecular Biology* **44**, 445-450.
- Ober, D., Harms, R., Witte, L. und Hartmann, T.** (2003a). Molecular evolution by change of function: alkaloid-specific homospermidine synthase retained all properties of deoxyhypusine synthase except binding the eIF5A precursor protein. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 12805-12812.
- Ober, D., Gibas, L., Witte, L. und Hartmann, T.** (2003b). Evidence for general occurrence of homospermidine in plants and its supposed origin as by-product of deoxyhypusine synthase. *Phytochemistry* **62**, 339-344.
- Park, M.H., Lee, Y.B. und Joe, Y.A.** (1997). Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. *Biological Signals* **6**, 115-123.
- Pichersky, E. und Gang, D.R.** (2000). Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in Plant Science* **5**, 439-445.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. und Belfrage, G.** (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**, 598-599.

- Rana, J. und Robbins, D.J.** (1983). Intact incorporation of [1,9-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-homospermidine into retronecine. *Journal of Chemical Research, Synopses*, 146-147.
- Reimann, A., Nurhayati, N., Backenkohler, A. und Ober, D.** (2004). Repeated Evolution of the Pyrrolizidine Alkaloid-Mediated Defense System in Separate Angiosperm Lineages. 10.1105/tpc.104.023176. *Plant Cell* **16**, 2772-2784.
- Robbins, D.J.** (1989). Biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids. *Chemical Society Reviews* **18**, 375-408.
- Romero, I., Fuertes, A., Benito, M.J., Malpica, J.M., Leyva, A. und Paz-Ares, J.** (1998). More than 80R2R3-MYB regulatory genes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **14**, 273-284.
- Rosenberg, A.H., Lade, B.N., Chui, D.S. Lin, S.W., Dunn, J.J. und Studier, F.W.** (1987). Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* **56**, 125-135.
- Sander, H. und Hartmann, T.** (1989). Site of synthesis, metabolism and translocation of senecionine *N*-oxide in cultured roots of *Senecio erucifolius*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **18**, 19-32.
- Schwelberger, H.G., Kang, H.A. und Hershey, J.W.** (1993). Translation initiation factor eIF-5A expressed from either of two yeast genes or from human cDNA. Functional identity under aerobic and anaerobic conditions. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 14018-14025.
- Scott, J.G. und Wen, Z.** (2001). Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. *Pest Management Science* **57**, 958-967.
- Shahmuradov, I.A., Gammerman, A.J., Hancock, J.M., Bramley, P.M. und Solovyev, V.V.** (2003). PlantProm: A database of plant promotor sequences. *Nucleic Acids Research* **31** (1), 114-117.

- Spenser, I.D.** (1985). Stereochemical aspects of the biosynthetic routes leading to the pyrrolizidine and quinolizidine alkaloids. *Pure and Applied Chemistry* **57**, 453-470.
- Steffens, N.O., Galuschka, C., Schindler, M., Bulow, L. und Hehl, R.** (2004). AthaMap: an online resource for in silico transcription factor binding sites in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Nucleic Acids Research* **32**, D368-372.
- Steffens, N.O., Galuschka, C., Schindler, M., Bulow, L. und Hehl, R.** (2005). AthaMap web tools for database-assisted identification of combinatorial cis-regulatory elements and the display of highly conserved transcription factor binding sites in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research* **33**, W397-402.
- Stegelmeier, B.L., Edgar, J.A., Colegate, S.M., Gardner, D.R., Schoch, T.K., Coulombe, R.A. und Molyneux, R.J.** (1999). Pyrrolizidine alkaloid plants, metabolism and toxicity. *Journal of Natural Toxins* **8**, 95-116.
- Studier, F.W. und Moffat, B.A.** (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology* **189**, 113-130.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. und Dubendorf, J.W.** (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods in Enzymology* **185**, 60-89.
- Swain, T.** (1977). Secondary compounds as protective agents. *Annual Review of Plant Physiology* **28**, 479-501.
- Swanson, W.J. und Vacquier, V.D.** (1998). Concerted evolution in an egg receptor for a rapidly evolving abalone sperm protein. *Science* **281**, 710-712.
- Tao, Y., Skrenta, H.M. und Chen, K.Y.** (1994). Deoxyhypusine synthase assay based on the use of polyhistidine-tagged substrate and metal chelate-affinity chromatography. *Analytical Biochemistry* **221**, 103-108.

- Toppel, G., Witte, L., Riebesehl, B., von Borstel, K. und Hartmann, T.** (1987). Alkaloid patterns and biosynthetic capacity of root cultures from some pyrrolizidine alkaloid producing *Senecio* species. *Plant Cell* **11**, 1743-1754.
- Van Dam, N.M., Witte, L., Theuring, C. und Hartmann, T.** (1995). Distribution, biosynthesis and turnover of pyrrolizidine alkaloids in *Cynoglossum officinale*. *Phytochemistry* **39**, 287-292.
- van Helden, J.** (2003). Regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Research* **31**, 3593-3596.
- Vanin, E.F.** (1985). Processed pseudogenes: characteristics and evolution. *Annual Review of Genetics* **19**, 253-272.
- Wagner, A.** (1998). The fate of duplicated genes: loss or new function? *Bioessays* **20**, 785-788.
- Wang, T.W., Lu, L., Wang, D. und Thompson, J.E.** (2001). Isolation and characterization of senescence-induced cDNAs encoding deoxyhypusine synthase and eucaryotic translation initiation factor 5A from tomato. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 17541-17549.
- Wilson, T.G.** (2001). Resistance of *Drosophila* to toxins. *Annual Review of Entomology* **46**, 545-571.
- Wink, M.** (1988). Plant breeding: Importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theoretical and Applied Genetic* **75**, 225-233.
- Yan, Y.P., Tao, Y. und Chen, K.Y.** (1996). Molecular cloning and functional expression of human deoxyhypusine synthase cDNA based on expressed sequence tag information. *Biochemical Journal* **315 ( Pt 2)**, 429-434.

- Zimmer, E.A., Martin, S.L., Beverley, S.M., Kan, Y.W. und Wilson, A.C.** (1980). Rapid duplication and loss of genes coding for the alpha chains of hemoglobin. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America **77**, 2158-2162.

## 7. Anhang

**Tab. 7.1:** Verwendete Expressionsprimer zur Amplifikation der unterschiedlichen *hss*- und *dhs*-Gene

Pflanze	Gen	Richtung	Oligonukleotidsequenz der Expressions-Primer	T <sub>m</sub> (°C)
<i>C. officinale</i>	<i>dhs</i>	Forward	P76 5'-TAC TCG AGA TGG GGG AAG CCT TGA AAG AGC AA-3'	69,5
		Reverse	P77 5'-ATT GGA TCC TCA CAA CTT GTT ATC TGC AGA TTT ACT-3'	66,1
	<i>hss</i>	Forward	P74 5'-ATA TAC ATA TGG GAG AAG TAG CAA CCA GCA ACA A-3'	65,9
		Reverse	P75 5'-ATT GGA TCC TCA CTT AGA TTT TTT ATC TGC AAT CTT C-3'	65,0
<i>H. indicum</i>	<i>dhs</i>	Forward	P82 5'-TAC TCG AGA TGG GAG ATG TGA GTG AAG AGC AG-3'	69,5
		Reverse	P83 5'-ATT GGA TCC CTA GCC AGA TTT ATT TAC TTT TGT GG-3'	66,0
	<i>hss</i>	Forward	siehe Beschreibung Inverse PCR	
		Reverse		
<i>S. officinale</i>	<i>dhs</i>	Forward	P78 5'-TAC TCG AGA TGG GTG AAG CCA TGA AAG AGC AG-3'	69,5
		Reverse	P79 5'-ATT GGA TCC TCA CAA CTT GTT TTC TGC AGA TTT AGT-3'	66,1
	<i>hss</i>	Forward	P72 5'-TAC TCG AGA TGG GGG AAG TAG CCG CTG CT-3'	70,9
		Reverse	P73 5'-TAT GAT CAT CAC TTA GAT AAA TTA TTT GCC TGT TT-3'	61,3
<i>P. hybridus</i>	<i>dhs</i>	Forward	P86 5'-TAC TCG AGA TGG GGG AAT CTT TGA AAC AAG CG-3'	68,2
		Reverse	P87 5'-ATT GGA TCC TTA TTT CTC TCG CTT TGC AGC AAA TG-3'	67,1
	<i>hss</i>	Forward	P84 5'-ATA TAC ATA TGG GGT CTA ACA AAC AAG CAG AGA-3'	64,5
		Reverse	P85 5'-ATT GGA TCC TTA AAA GCC ATT GAC TTT AGA TGC TTT-3'	64,9
<i>E. cannabinum</i>	<i>dhs</i>	Forward	P66 5'-ATC TAG ACT CGA GAT GGG GGA ACC CAC TAA AGA AG -3'	70,6
		Reverse	P67 5'-TAA GGA TCC CTA TCC AGA ACT TGG TTT TGA ATC-3'	65,8
	<i>hss</i>	Forward	P64 5'-TAT CTA GAA TGG CGG CAG CAA TTA AAG AAG-3'	64,0
		Reverse	P65 5'-TAA GGA TCC TTA TGC GGA ACA TAG TTT CTT CT-3'	64,4

**Tab. 7.2:** PCR-Bedingungen zur Amplifikation der jeweiligen *dhs*- und *hss*-Gene. Neben den erhaltenen Längen der entsprechenden Exon- und Intron-Strukturen der Gene sind die Längen der dazugehörigen cDNAs mit angegeben

Pflanze	Gen	Richtung	Primer	Annealingtemperatur	Zyklenzahl	Amplifikatlänge	Länge der cDNA
<i>C. officinale</i>	<i>dhs</i>	Forward	P76	65,0	30	4034bp	1119bp
		Reverse	P77				
	<i>hss</i>	Forward	P74	65,0	30	3800bp	1110bp
		Reverse	P75				
<i>H. indicum</i>	<i>dhs</i>	Forward	P82	65,0	33	3175bp	1116bp
		Reverse	P83				
	<i>hss</i>	Forward	I.P01; II.P03	siehe Beschreibung Inverse PCR (3.5.2)		3180bp	1095bp
		Reverse	I.P02; II.P81				
<i>S. officinale</i>	<i>dhs</i>	Forward	P78	65,0	30	4378bp	1119bp
		Reverse	P79				
	<i>hss</i>	Forward	P72	65,0	30	1703bp	1128bp
		Reverse	P73				
<i>P. hybridus</i>	<i>dhs</i>	Forward	P86	68,0	30	2221bp	1098bp
		Reverse	P87				
	<i>hss</i>	Forward	P84	68,0	30	1960bp	1110bp
		Reverse	P85				
<i>E. cannabinum</i>	<i>dhs</i>	Forward	P66	68,0	30	2630bp	1125bp
		Reverse	P67				
	<i>hss</i>	Forward	P64	68,0	30	5056bp	1128bp
		Reverse	P65				

**Tab. 7.3:** Primer für die Inverse-PCR zur Amplifikation der HSS-Promotoren in den untersuchten Boraginaceae

Pflanze	Promotor	Richtung	Oligonukleotidsequenz der Primer
<i>C. officinale</i>	<i>hss</i> -Gen	Forward	PIP1 5'-CAT GCT AAA CTG GAG ACT ATC TCA TGA TA-3'
		Reverse	PIP2 5'-GCA TCT CCA AGC TGA GAA GCC TGA AA-3'
<i>H. indicum</i>	<i>hss</i> -Gen	Forward	PIP3 5'-AGG TGT AAA TTA TGC GGA GCT TCT CAA AT-3'
			PIP5 5'-GAA TAT GGT GCG CTG TTT CTT GTT GAA AT-3'
		Reverse	PIP4 5'-TGA CTT TGG CTG AGC CGT CAA GGT TTT-3'
			P81 5'-ATT GGA TCC TTA ACT TGA TTT CTT CAC CTT TGC AAA-3'
<i>S. officinale</i>	<i>hss</i> -Gen	Forward	PIP6 5'-CTT CTC ATC TTG GAG ATG CCA TCC AAA T-3'
		Reverse	PIP7 5'-CAT ATG ATT TGA GAA GAA GGT CGT AGT TAA-3'

PIP: Primer Inverse PCR

**Abb. 7.4: Nukleotidsequenz der HSS-cDNA aus *Cynoglossum officinale***

```

1 CCACAATCTAAAAGCAATCACAATAAGATAAGTTGTACTACTTCTTAAGCTAGCATCAAT 60
                                     P74
TTTCAAAGTAACAATGGGAGAAGTAGCAACCAGCAACAATGCCTTGGACTCTGTAAGGTC
61 -----+-----+-----+-----+-----+ 120
b      M G E V A T S N N A L D S V R S -

TGCAATTGTTCAAGAAATCAGAAAATTTGGAAGGCTCATCTAAGATCATTGGTTATGATTT
121 -----+-----+-----+-----+-----+ 180
b      A L F K K S E N L E G S S K I I G Y D F -

CAATGGTGGTGTAACTATGAGGATCTTCTCAAATCCTTAGTCACCTCTGGCTTTCAGGC
181 -----+-----+-----+-----+-----+ 240
b      N G G V N Y E D L L K S L V T S G F Q A -

PIP 2                                     PIP 1
TTCTCAGCCTGGAGATGCCCATCCAAATTGTCAATGACATGCTAAACTGGAGACTATCTCA
241 -----+-----+-----+-----+-----+ 300
b      S Q L G D A I Q I V N D M L N W R L S H -

TGATAGCCCATCAGAGGACTGTAGTGAAGAAGAGAAAGATCCAAAATTCAGAGAAGGTGT
301 -----+-----+-----+-----+-----+ 360
b      D S P S E D C S E E E K D P K F R E G V -

AAAATGCAAGATTTTCCTTGGTTTCACTTCAAATCTCATTTCTTCTGGCCTACGTGAGAC
361 -----+-----+-----+-----+-----+ 420
b      K C K I F L G F T S N L I S S G L R E T -

ATTTGATATCTCGCTCAACATCGCATGGTGGATGTGATGGTTACAACCTGCTGGTGGTAT
421 -----+-----+-----+-----+-----+ 480
b      F R Y L A Q H R M V D V M V T T A G G I -

AGAAGAGGACCTGATAAAATGCCTTGGTGATACTTACAAAGGTGATTTTGCTTTGCCTGG
481 -----+-----+-----+-----+-----+ 540
b      E E D L I K C L G D T Y K G D F A L P G -

AGCTATGCTTTCGATCAAAAGGACTGAACCGCATTGGAAATATGTTGGTTCCTAATGATAA
541 -----+-----+-----+-----+-----+ 600
b      A M L R S K G L N R I G N M L V P N D N -

TTACTGTAAGTTTGAGGACTGGATAATGGCTATTTTGGACAAGATGTTAGAAGAGCAAAT
601 -----+-----+-----+-----+-----+ 660
b      Y C K F E D W I M A I L D K M L E E Q I -

ATCTGAGAAAAAATTGTGGACACCATCTAGAGTTATTGCTCGACTTGGAAGAAATCAA
661 -----+-----+-----+-----+-----+ 720
b      S E K K L W T P S R V I A R L G K E I N -

TGATGAAAGCTCGTATTTGTACTGGGCATACAAGAACAACATCCCTGTGTTTTGCCAGC
721 -----+-----+-----+-----+-----+ 780
b      D E S S Y L Y W A Y K N N I P V F C P A -

TTTGACTGATGGTTCAATTGGAGACATGTTGTACTTGCATGCCAGCCGCAATAAACCCAG
781 -----+-----+-----+-----+-----+ 840
b      L T D G S I G D M L Y L H A S R N K P S -

TTTAGTCCTTGACATTGTGCAAGATGTATGTGCTATGGACGATGAGTCAGTCAATGCAAG
841 -----+-----+-----+-----+-----+ 900
b      L V L D I V Q D V C A M D D E S V N A S -

```



**P50**

901 TCCGAGGAAGACCGGAATAATAATCCTGGGAGGAGGACTACCAAAGCATCACATTTGCAA 960  
b P R K T G I I I L G G G L P K H H I C N -

961 TGCCAACATGATGCGTGGTGGTGCCGATTTGCGCCGTGTATATCAACACTGCTCAAGAATT 1020  
b A N M M R G G A D F A V Y I N T A Q E F -

1021 CGACGGTAGCGATTCCGGTGCTCGTCCCGATGAAGCGATTTCTGCGGGGAAAATCCGGGC 1080  
b D G S D S G A R P D E A I S W G K I R A -

1081 CAACGCCAAGAATGTCAAGGTTTATTGTGATGCAACTATTGCCTTCCCATTGGTGGTGGC 1140  
b N A K N V K V H C D A T I A F P L V V A -

**P75**

1141 TGAAACATTTGCTACGAAGATTGCAGATAAAAAATCTAAGTGAGAATGGATTGACGATCA 1200  
b E T F A T K I A D K K S K \*

1201 CCAGGGTCGATGAAATCAATTCTCGTATCAGATTGCCATGTGATGATGAATGAAGGCTCT 1260

1261 AGCTACTTTCTTTATCAGTTCTGCTGGATTGAGTTTCTGTCTTTTAAAGTATGCTTGTGT 1320

1321 TATCAATAAGGCAACCTCTGTATTAATATTCAGAATTTTGCTTTCAATAAAATGTCAGTT 1380

1381 AGTTCCTC 1388

**Abb. 7.5: Nukleotidsequenz der DHS-cDNA aus *Cynoglossum officinale***

```

1  TTCAAATCAACATCCATAACTTCCAAACATGGAAATCATGCTTCTATGAATGTGGTGATT 60
61  ATAGTTATCTGTGGTGATTGTGTAATTGGTACTTGAACCCTCTTTTCATTGAGACTGTGC 120
      CATTTTTGAAAATGGGGGAAGCCTTGAAGAGCAACAACTTTTGAATCTATAAGGTCAG
121  -----+-----+-----+-----+-----+ 180
c      M G E A L K E Q Q L L E S I R S V -
      TAGTTTTGAAGCAATCAGAGAATCTTGAGGACAAATGTACCAAAATTGAGGGATACAATT
181  -----+-----+-----+-----+-----+ 240
c      V L K Q S E N L E D K C T K I E G Y N F -
      TTAATAATGGAGTTAACTATCAACAACCTTCTCAAATCTTTGTCCTCCACTGGCTTCCAAG
241  -----+-----+-----+-----+-----+ 300
c      N N G V N Y Q Q L L K S L S S T G F Q A -
      CTCCAATCTTGGTGATGCTATCCAAGTTGTTAATCAGATGTTGGATTGGAAGCTGTCTGG
301  -----+-----+-----+-----+-----+ 360
c      S N L G D A I Q V V N Q M L D W K L S D -
      ATGAGTGCCCCACAGAGGATTGCAGTGAACTGAGAAAGACCCAGCCTATAGAGAATCAG
361  -----+-----+-----+-----+-----+ 420
c      E C P T E D C S E T E K D P A Y R E S V -
      TGAAGTGCAAAATATTTCTTGGTTTCACTTCTAATCTAGTTTCTTCTGGGATTCGAGATA
421  -----+-----+-----+-----+-----+ 480
c      K C K I F L G F T S N L V S S G I R D I -
      TCATCCGATATCTTGTTCAGCATTCTATGGTTGATGTTGTTGTTACAACAGCTGGTGGTG
481  -----+-----+-----+-----+-----+ 540
c      I R Y L V Q H S M V D V V V T T A G G V -
      TGGAAGAGGATCTCATAAAGTGCCTTGCTCCTACTTATAGAGGTGACTTTTCTCTATCAG
541  -----+-----+-----+-----+-----+ 600
c      E E D L I K C L A P T Y R G D F S L S G -
      GGGCAGTTCTCCGTTCAAAGGGCTGAACAGAATTGGAATTTACTGGTTCCTAATGATA
601  -----+-----+-----+-----+-----+ 660
c      A V L R S K G L N R I G N L L V P N D N -
      ATTATTGCAAATTTGAGGATTGGATTATGAATATCTTTGACCAAATGATGGAGGAACAA
661  -----+-----+-----+-----+-----+ 720
c      Y C K F E D W I M N I F D Q M M E E Q N -
      ACACGAAGAAAATTTTGTGGACACCATCTAAAGTCATTTCTCGCCTTGGAAGAAATCA
721  -----+-----+-----+-----+-----+ 780
c      T K K I L W T P S K V I S R L G K E I N -
      ATGATGAGAGTTCGTACTTGTACTGGGCAACAAGAACATATACCTGTCTACTGCCCTG
781  -----+-----+-----+-----+-----+ 840
c      D E S S Y L Y W A N K N N I P V Y C P G -
      GTTTGACGGATGGCTCTCTAGGTGACATGCTATACATACATTTCTATACGCAAAGACCCTG
841  -----+-----+-----+-----+-----+ 900
c      L T D G S L G D M L Y I H S I R K D P G -
      GTCTAGTTGTTGATGTTGTGCAAGATATTAGGTCAATGAACAGTGAGGCTGTACATGCTG
901  -----+-----+-----+-----+-----+ 960
c      L V V D V V Q D I R S M N S E A V H A G -

```

**P76**

**P45**

**P48**

**P47**

**P46**

```

          GTCTTAGGAAGACTGGGATAATTGTTCTAGGGGGAGGGTTGCCCAAGCATCACATATGCA
961  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
c      L R K T G I I V L G G G L P K H H I C N -

          ATGCAAACATGATGAGAAATGGTGCTGATTTTGCCGTATTTATCAACACAGCTCAGGAGT
1021  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
c      A N M M R N G A D F A V F I N T A Q E F -

          TCGATGGAAGTGACTCTGGTGCATGTCCGGATGAAGCAGTGTTCATGGGGAAAGATACGAG
1081  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
c      D G S D S G A C P D E A V S W G K I R G -

          GTTCTGCAAAGACTGTGAAGGTCCACTGTGATGCAACCATTGCTTTCCCTCTCCTTGTCG
1141  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
c      S A K T V K V H C D A T I A F P L L V A -

          CAGAAACATTTGCAACAAAGGCAAGTAAATCTGCAGATAACAAGTTGTGATTCTGACCAA
1201  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
c      E T F A T K A S K S A D N K L *

1261  TTCCTCCCATAATTAGGGATTGTTACAGCCAACTTTGTGTATCTTGGTTTCGAGAGTGAG 1320
1321  TTAGTAATTGTTCAATACATTATAGTATATTGAGATTTTTGTTTATGCGATTAATTGTGG 1380
1381  CCTAGAATTTATTGCTTCTTTCACATTTATTTCCCCTGATATAACTGATATTGGTATAAT 1440
1441  TATGATGTGGATAACTCAAGG 1461
```

**Abb. 7.6: Nukleotidsequenz der HSS-cDNA aus *Heliotropium indicum***

```

1  AAGCAAAATTTAGAAACCTCTCTTATCTTCTCAGTCATTTTTTTGAAGTACTCAACAAAAC 60
                                     P80
AAAGCAAAAAATGGGAGAGGTAGCCACAAATGCTTTGGACTCAGTCCGATCACAATTGTT
61  -----+-----+-----+-----+-----+ 120
b      M  G  E  V  A  T  N  A  L  D  S  V  R  S  Q  L  F  -

                                     PIP 4
TAAGAAATCAGAAAACCTTGACGGCTCAGCCAAAGTCATTGGATATGATTTCAACAAAGG
121  -----+-----+-----+-----+-----+ 180
b      K  K  S  E  N  L  D  G  S  A  K  V  I  G  Y  D  F  N  K  G  -

                                     PIP 3
TGTAAATTATGCGGAGCTTCTCAAATCTATGGTCACCACTGGCTTCCAAGCCTCCCATCT
181  -----+-----+-----+-----+-----+ 240
b      V  N  Y  A  E  L  L  K  S  M  V  T  T  G  F  Q  A  S  H  L  -

TGCGGACGCTATGGATTGCATTAATGACATGTTGAAATGGAGATTGTCACATGAGACACC
241  -----+-----+-----+-----+-----+ 300
b      G  D  A  M  D  C  I  N  D  M  L  K  W  R  L  S  H  E  T  P  -

TACAGAAGGCTGTAGCGAGCAGGAGAAAGATCCAGCTTATAGAGAATCTGTGAAGTGCAA
301  -----+-----+-----+-----+-----+ 360
b      T  E  G  C  S  E  Q  E  K  D  P  A  Y  R  E  S  V  K  C  K  -

GATTTTCCTTGGTTTCACTTCAAACCTTACTTCTTCTGGTGTTCGAGAGACCCTTCGCTA
361  -----+-----+-----+-----+-----+ 420
b      I  F  L  G  F  T  S  N  L  T  S  S  G  V  R  E  T  L  R  Y  -

TCTGTGCCAACATCGCATGATCGATGTGCTAGTTACAACGGCTGGTGGTATTGAAGAGGA
421  -----+-----+-----+-----+-----+ 480
b      L  C  Q  H  R  M  I  D  V  L  V  T  T  A  G  G  I  E  E  D  -

CTTCATAAAATGCCTTGGTGATACTTACAGAGGTGACTTTGCCCTACAAGGCTCTATGCT
481  -----+-----+-----+-----+-----+ 540
b      F  I  K  C  L  G  D  T  Y  R  G  D  F  A  L  Q  G  S  M  L  -

GCGTTCTAAAGGATTAAATCGCATTGGTAATCTGTTGGTCCCTAATGACAATTATTGCAA
541  -----+-----+-----+-----+-----+ 600
b      R  S  K  G  L  N  R  I  G  N  L  L  V  P  N  D  N  Y  C  K  -

ATTTGAGGATTGGATCATGGGTATCCTCGATCAAATGTTGGAAGAGCAGAAAACACAGAA
601  -----+-----+-----+-----+-----+ 660
b      F  E  D  W  I  M  G  I  L  D  Q  M  L  E  E  Q  K  T  Q  K  -

AGTATTGTGGACACCATCCAAAGTTATTGCTCGACTTGGGAAAGAAATCAATGACGAGAG
661  -----+-----+-----+-----+-----+ 720
b      V  L  W  T  P  S  K  V  I  A  R  L  G  K  E  I  N  D  E  S  -

CTCATTCTTGTACTGGGCATCCAAGAACAACATTCCAGTCTTCTGCCCAGCTTTGACAGA
721  -----+-----+-----+-----+-----+ 780
b      S  F  L  Y  W  A  S  K  N  N  I  P  V  F  C  P  A  L  T  D  -

                                     P30
TGGGTCAATCGGTGACATGCTCTACTTGCATGCTAACAACAATAGCCCTGGTTTtagTTGT
781  -----+-----+-----+-----+-----+ 840
b      G  S  I  G  D  M  L  Y  L  H  A  N  N  N  S  P  G  L  V  V  -

                                     P33
TGACATCGTTGAAGATGCGAGGGCCATGGACAATGAAGGCTGTACATGCTGACCCAAGAAA
841  -----+-----+-----+-----+-----+ 900
b      D  I  V  E  D  A  R  A  M  D  N  E  A  V  H  A  D  P  R  K  -

```

**P32**  
GACGGAATAATAATTCTTGGGGGAGGATTGCCAAAACATCATATATGCAATGCTAATAT

901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960  
b T G I I I L G G G L P K H H I C N A N M -

GATGCGTGGTGGTGCTGATTTTGCTGTGTACATTAACACCGCTCAAGAATTTGATGGAAG

961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020  
b M R G G A D F A V Y I N T A Q E F D G S -

TGATTCCGGTGCTCGTCCCGACGAAGCCGTATCTTGGGGTAAATCCGAGCTTCTGCCAA

1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080  
b D S G A R P D E A V S W G K I R A S A K -

GAAAGTGAAGGTCCATTGTGATGCAACTATCGCATTCCCTCTTGTAGTGGCAGAAACC**TT**

1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140  
b K V K V H C D A T I A F P L V V A E T F -

**P81**  
TGCAAAGGTGAAGAAATCAAGTTAAGAAGGAAATCAGTGCTTTTCCCTCCAAGAGTCCCAT

1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200  
b A K V K K S S \*

1201 GGAAGCCAATTCTTGGTGGAATATGACTTCTGGGTTTTTTTTTTTGATTAAATAAAGTAAT 1260

1261 TGTAGTTAAATAAATGTGCGTTATAATCATGTAAGTGTTGCTTTCTAGGCTCGTTTCTTG 1320

1321 TAGCAAATAATAAAGGAAGGCATCCCTCGATGTTTCTATATATGCAATGGAATGAGTCAT 1380

1381 CAATTATAAGTTGTTATGTTTCACG 1405

**Abb. 7.7: Nukleotidsequenz der DHS-cDNA aus *Heliotropium indicum***

```

1  AACAAAGAACGTGGGAAATTTTAGAGGTGTCAGTTTTGGTCCGAGAAGAAAGCAGCTGAGC 60
61  TGTGCTTGAAGAACAAGAATTACGTCAATTGAGTAGCAGCCAGCGATTACAATAATCAAA 120
      GAAAACP82
      GAAAACCATGGGAGATGTGAGTGAAGAGCAGCAGCAGCAACTATTGGCTTCCATACGATCA
121  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
a      M G D V S E E Q Q Q Q L L A S I R S -
      GTGGTGTTGAAGCAATCCGAAATCTAGAAGCTTCCTCCGCCACCAAATCCAGGGCTAC
181  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
a      V V L K Q S E N L E A S S A T K I Q G Y -
      GATTTCAACCGCGCGTTAACTATCCCGACCTTCTCAAATCCTTGTCTCTACTGGGTTT
241  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
a      D F N R G V N Y P D L L K S L S S T G F -
      CAAGCTTCCAATCTCGGCGATGCCATTCAAGTCGTCAACCAAATGCTAAACTGGAAGCTA
301  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
a      Q A S N L G D A I Q V V N Q M L N W K L -
      TCGGATGAATGTCCACGGAGGAATGCAGTGACAAGGAGAGAGACCCGGCATTTAGAGAC
361  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
a      S D E C P T E E C S D K E R D P A F R D -
      TCTGTTAGGTGCAAGATTTTCCTTGGTTTCACTTCAAATCCTTGTCTTTCAGGGGTTCTGA
421  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
a      S V R C K I F L G F T S N L V S S G V R -
      GACATTATTCGATATCTTGTTC AACATCACTTGGTTGATGTAATTGTTACAACAGCTGGT
481  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
a      D I I R Y L V Q H H L V D V I V T T A G -
      GGGGTGGAAGAGGATCTTATAAAATGCCTTGC GCCTACTTATAGAGGTGATTTTTCTTTA
541  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
a      G V E E D L I K C L A P T Y R G D F S L -
      CCTGGAGCCGTTCTACGTTCAAAGGACTGAATCGGATTGGAAATTTGTTGGTTTCCTAAT
601  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
a      P G A V L R S K G L N R I G N L L V P N -
      GATAACTACTGCAAATTCGAGGATTGGATTATGAATATTTTGTATCGAATGATGGAGGAG
661  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
a      D N Y C K F E D W I M N I F D R M M E E -
      CAGAATTCAGAGAAAGTATTGTGGACACCGTCTAAAGTTATTTCTCGGCTTGGGAAAGAA
721  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
a      Q N S E K V L W T P S K V I S R L G K E -
      ATCAATGATGAAAGCTCATACTTGTACTGGGCATACAAGAACAACATTCCTGTCTATTGC
781  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
a      I N D E S S Y L Y W A Y K N N I P V Y C -
      CCTGGTCTGACAGATGGTTCACTTGGTGAP34
      CCTGGTCTGACAGATGGTTCACTTGGTGACATGTTATACATACATGCTATCCGCAAAGAC
841  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
a      P G L T D G S L G D M L Y I H A I R K D -
      CCTGGTCTAGTTGTTGATGTTGTGAAAGATP37
      CCTGGTCTAGTTGTTGATGTTGTGAAAGATATTAGGGCCATGAACAGTGAGGCTGTACAT
901  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
a      P G L V V D V V K D I R A M N S E A V H -

```

**P36**

961 GCTGGCTTGAGGAAGACAGGAATTATTGTTCTTGGGGGAGGGTTGCCCAAGCATCACATA 1020  
a -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
A G L R K T G I I V L G G G L P K H H I -

**P35**

1021 TGCAATGCCAATATGATGCGTAATGGTGCTGATTTTGCCGTGTTTATTAACACGGCACAG  
a -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080  
C N A N M M R N G A D F A V F I N T A Q -

**P83**

1081 GAATTTGATGGAAGTGACTCTGGTGCACGTCCTGATGAAGCTGTGTCTTGGGGAAAAATA  
a -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140  
E F D G S D S G A R P D E A V S W G K I -

1141 CGAGGTTCCGCCAAGACTGTGAAGGTTTCATTGTGATGCAACCATTGCCTTCCCTCTCCTG  
a -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200  
R G S A K T V K V H C D A T I A F P L L -

**P83**

1201 GTGGCAGAAACATTTGCCACAAAAGTAAATAAATCTGGCTAGGCTGAGGTCCGGAAACCT  
a -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260  
V A E T F A T K V N K S G \*

1261 TACCTGTGGCCAAGACGTGTAATGATATCAGCATTATGGAATGGAGTTGGATCCTTGTTG 1320

1321 AAGATTCCATAACATTCAGATCTTATAGCTGCTAAGCTTCCTAGATCATGTTCTTCAAG 1380

1381 CATAGTTTCTGCAGCAAAGGACCTAGTGTTAATACTCAAATTTTGGACCGATCTTCTCAC 1440

1441 ACTTACATGCCACATAGGCACGGACAAATCCGAGCATTTAGATCTTACTGGTGGCTTCAA 1500

1501 TTTGCTTTTGGTTTTCCATCGTGAATGATTAACCAAAGTGGAGTGATGTGCTAATCATCC 1560

1561 TCTGCTGGGACGACCGTGGAAAGGAAATATGATTATTATCGGTGATCAATCAACTCTGCC 1620

1621 TTGTATTACAAAAGTGCTCTCTGATACCCTTCACCAAATTCATTCAGCTGAATATTTACTG 1680

1681 TCAGCAACAGTTGCTTACTTTAAGAAAAGAAATGGTATTACTTTGGCTTCCCTTTGATTT 1740

1741 ACTCCTGCTTAGACGAACCTGTAGTTGACTCATGTTAATTATGCTAAAGTGAAGGTTTAA 1800

1801 TTTGCAT 1807

**Abb. 7.8: Nukleotidsequenz der HSS-cDNA aus *Symphytum officinale***

```

1  TGCCACAACAATAATCAAGATATATATATATAGAACAAACATAAAGTTCTTATATTTTTTT 60
      P72
AAACAATAATGGGGGAAGTAGCCGCTGCTGCCAGCAACAACAACCTCTGCCTTAGACTCTG
61  -+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
c      M G E V A A A A S N N N S A L D S V -

TAAGGTCTGCCTTGTTTAAGAAATCAGAGAATTTGGAAGGATCCTCTAATAAGATCATTG
121 -+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
c      R S A L F K K S E N L E G S S N K I I G -

      PIP 7
GCTATGACTTCAATGGAGGAGTTAACTACGACCTTCTTCTCAAATCATATGTCGCCTCTG
181 -+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
c      Y D F N G G V N Y D L L L K S Y V A S G -

      PIP 6
GCTTTCAGGCTTCTCATCTTGGAGATGCCATCCAAATTGTTAATGACATGCTAAGCTGGA
241 -+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
c      F Q A S H L G D A I Q I V N D M L S W R -

GATTATCTCATGAAAGTCCAACAGAAGACTGCAGTGAAGAGGAGAAAGATACATTATTCA
301 -+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
c      L S H E S P T E D C S E E E K D T L F R -

GAGAATCCGTTAAGTGCAAGATTTTTCTTGGTTTCACTTCAAATCTTGTCTTCTTGGAC
361 -+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
c      E S V K C K I F L G F T S N L V S S G L -

TGCGTGAGACATTTAAATATCTGGCTCAACATCGCATGGTGGATGTGATGGTTACAACAG
421 -+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
c      R E T F K Y L A Q H R M V D V M V T T A -

CTGGTGGAAATAGAAGAGGACCTTATAAAATGTCTTGGACATACTTACAAAGGTGATTTTG
481 -+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
c      G G I E E D L I K C L G H T Y K G D F A -

      P44
CCTTACCTGGAGCTATGCTAAGATCAAAAGGACTCAACCGCATTGGTAATATGTTGGTTC
541 -+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
c      L P G A M L R S K G L N R I G N M L V P -

      P43          P42
CTAATGATTAATTACTGTAAGTTTGAGGACTGGAATAATGAACATTTTGGACAAGATGTTAG
601 -+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
c      N D N Y C K F E D W I M N I L D K M L E -

      P41
AAGAACAATAAACGAGAAAAAACTGTGGACACCATCTACTGTTATTGCTCGACTTGGAA
661 -+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
c      E Q I N E K K L W T P S T V I A R L G K -

AAGAAATCAATGACGAGAGCTCCTACTTGTACTGGGCATACAAGAACAACATTCCAGTGT
721 -+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
c      E I N D E S S Y L Y W A Y K N N I P V F -

TTTGCCCAGCTTTGACTGATGGTTCAATTGGAGACATGTTGTACTTGCATGCCAGCCGCA
781 -+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
c      C P A L T D G S I G D M L Y L H A S R N -

ACAAACCCAGTTTAATCGTTGACATTGTTTCAGGATGTAAGTGCTATGGACAATGAATCAG
841 -+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
c      K P S L I V D I V Q D V S A M D N E S V -

```



```

      TGAATGTTGTTAGTCCAAGAAAGACAGGGATAATAATCCTGGGTGGTGGACTGCCTAAGC
901  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
c      N V V S P R K T G I I I L G G G L P K H -
      ATCACATTTGCAATGCCAACATGATGCGTGGAGGCGCTGATTTTGCTGTCTATATCAATA
961  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
c      H I C N A N M M R G G A D F A V Y I N T -

      CTGCCCAAGAATTTGATGGAAGTGATTCTGGCGCCCGGCCTGATGAAGCTGTTTCGTGGG
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
c      A Q E F D G S D S G A R P D E A V S W G -

      GGAAAAATCCGCGAAAAACGCCAAGAAAGTTAAGGTTTCATTGTGATGCAACAATTGCCTTCC
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
c      K I R E N A K K V K V H C D A T I A F P -

                                     P73
      CTTTGGTGGTGGCTGAAACCTTTGCTGCAAAACAGGCAAATAATTTATCTAAGTGAATGAG
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
c      L V V A E T F A A K Q A N N L S K *

1201 AAGGGATGGATAAAAGGGGTCGATGCCATCAATTATTATTCTCTTATCTGATTATTATCTA 1260
1261 GTGAATGAGGATGATGAAGGCCCTAGCTCATTATTATTAGTTGTTATTGTGTTGCTGGAT 1320
1321 TGAGTTTCATTTTATGTTTGTATTATGAATAAGACTGACATGTCATATATTAAGAATGTT 1380
1381 ATCTCAAATTGAATAAAATGAGTTAGTATAAAATAATATAATAAATGTTGTTACATGTG 1440
```

**Abb. 7.9: Nukleotidsequenz der DHS-cDNA aus *Symphytum officinale***

```

1  TAAAAGCAAGTAAGCAACAAAAGGAAAGAATTGAAAAGTAGGCAGCTTCAGAATAAAACA  60
61  CCAAAGCTGATAAGCACCATTGTTTGTGTATATATCTTCCCCTGTCTTGTAGCTTGTGAA  120
      TATACCTGGTTTTTGAGACAAP01ATGGGTGAAGCCATGAAAGAGCAGCAACTTTTGAAACAA
121  -----+-----+-----+-----+ 180
c      M G E A M K E Q Q L L E T I -
      TAAGGTCAGTAGTTCTAAAGCAATCAGAGAATCTTCAAGATAAATGCACCAAAATCCAAG
181  -----+-----+-----+-----+ 240
c      R S V V L K Q S E N L Q D K C T K I Q G -
      GCTATGATTTTAATCAAGGAGTTAACTATCAAGAACTTCTCAAATCTTTGTCATCAACTG
241  -----+-----+-----+-----+ 300
c      Y D F N Q G V N Y Q E L L K S L S S T G -
      GATTTCAAGCCTCCAATCTTGGTGATGCAATTCAAGTCGTCATGAGATGCTAGATTGGA
301  -----+-----+-----+-----+ 360
c      F Q A S N L G D A I Q V V N E M L D W K -
      AGCTGTCAAATGAATGCCCCGCAGAGGACTGTAGTGAAAAGGAGAAAGAGCCAGCCTATA
361  -----+-----+-----+-----+ 420
c      L S N E C P A E D C S E K E K E P A Y R -
      GAGAATCAGTCAAGTGCAAGATATTTCTTGGATTACTTCTAATCTAGTTTCTTCTGGGA
421  -----+-----+-----+-----+ 480
c      E S V K C K I F L G F T S N L V S S G I -
      TTCGAGATATCATTCGATATCTTGTTCAGCATCATATGGTTGATGTAGTTGTTACAACAG
481  -----+-----+-----+-----+ 540
c      R D I I R Y L V Q H H M V D V V V T T A -
      CTGGTGGTGTAGAAGAGGATCTCATAAAATGCCTTGCTCCTACATATAGAGGTGACTTTT
541  -----+-----+-----+-----+ 600
c      G G V E E D L I K C L A P T Y R G D F S -
      CTCTACCTGGGGCCGATCTCCGTTCAAAGGGCTGAACCGAATTGGAAATTTACTGGTCC
601  -----+-----+-----+-----+ 660
c      L P G A D L R S K G L N R I G N L L V P -
      CTAATGATAATTATTGCAAATTTGAGGATTGGATTATGAACATCTTCGATCAAATGTTGG
661  -----+-----+-----+-----+ 720
c      N D N Y C K F E D W I M N I F D Q M L E -
      AGGAGCAAAACACAAAGAAAATTTTGTGGACACCATCTAAAGTCATATCTCGGCTTGGGA
721  -----+-----+-----+-----+ 780
c      E Q N T K K I L W T P S K V I S R L G K -
      AAGAAATCAATGACGAGAGCTCGTACCTGTACTGGGCACACAAGAACAACATACCCATCT
781  -----+-----+-----+-----+ 840
c      E I N D E S S Y L Y W A H K N N I P I Y -
      P40ACTGCCCTGGTTTGACCGATGGCTCTCTAGGCGACATGCTATACP39ATACATTCTATACGCA
841  -----+-----+-----+-----+ 900
c      C P G L T D G S L G D M L Y I H S I R K -
      P38AAGATCCTGGTCTAAGTTGTTGATGTTGTGCAAGATATTAGGTCCATGAATGGCGAGGCTG
901  -----+-----+-----+-----+ 960
c      D P G L V V D V V Q D I R S M N G E A V -

```

```
TACATGTTGGTCTGAGAAAGACTGGGATGATTATTCTAGGGGGAGGGTTGCCCAAACATC
961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
c      H V G L R K T G M I I L G G G L P K H H -

ACATATGCAATGCAAAACATGATGCGAAATGGTGCTGATTTTGCCGTATTTATCAACACAG
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
c      I C N A N M M R N G A D F A V F I N T A -

CTCAGGAGTTTGATGGAAGTGACTCCGGGGCACGTCCAGATGAAGCGGTGTCATGGGGAA
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
c      Q E F D G S D S G A R P D E A V S W G K -

AAATACGAGGTTCTGCTAAGACTGTGAAGGTCCACTGTGATGCAACGATTGCTTTCCCGC
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
c      I R G S A K T V K V H C D A T I A F P L -

TCCTTGTTGCAGAAACATTTGCCACAAAAGCAACTAAATCTGCAGAAAACAAGTTGTGAT
1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
c      L V A E T F A T K A T K S A E N K L *

1261 TCTGATAAAATCCTGGTGTGGATTAAATTTATGTTGAGATTGGTAAAATTTGTATTCTGA 1320
1321 TATTGGTCTGAAGGACTTACAAGGGGTTAGTTAGAACAGGGGGTAGTTTACTACTATTAT 1380
1381 AGGACGTGGAAGGCAATTATAGCGTTCCTACTGTGTTAACAAAATTCATTTTATACATTT 1440
1441 GAATACCATGTAATGTACTTCAAGGGAGAGATTATATGAAGGGGTTTTTTTCTTTTCT 1498
```

**P79**

P84

CAACTAAAACTTGCAGAAAATGGGGTCTAACAACAAGCAGAGATGATCGAGAGTGCGAGG

1 104

a +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60  
M G S N K Q A E M I E S A R -

TCTGCAGTATTCAAGGAATCGGAGAGTTTAGAAGGCACTTGTGCTAAAATAGGTGGCTAC

61 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120  
S A V F K E S E S L E G T C A K I G G Y -

GATTTCAACAATGGGATTAATCACTCACAGCTTCTCAAATCCATGGTTTCAACCGGATTC

121 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180  
D F N N G I N H S Q L L K S M V S T G F -

CAAGCTTCTAATCTTGGTGAAGCTATGGAAATTGTCAATCAAATGCTGGATTGGAGGCTA

181 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240  
Q A S N L G E A M E I V N Q M L D W R L -

TCTCATGAACAAGTACCAGAAAATTGCAGCGAGGAGGAGAAGAAGAACCGAGAGTCTGTCT

241 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300  
S H E Q V P E N C S E E E K K N R E S V -

AAGTGCAAAGTCTTCCTAGGGTTACATCAAACCTCATTTCGTCGGGTGTTTCGGGAGACT

301 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360  
K C K V F L G F T S N L I S S G V R E T -

ATTCGTTATCTAGCTCAACATCGTATGGTCGATGTGATTGTGACAACAACAGGTGGTATT

361 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420  
I R Y L A Q H R M V D V I V T T T G G I -

GAGGAAGATTTCATAAAATGCCTTGCAAGCACGTACAAAGGTAAATTTTCTTTACCAGGT

421 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480  
E E D F I K C L A S T Y K G K F S L P G -

**P52**

GCTGATTTGCGATCTAAAGGATTAAATCGCATCGGTAACTTGTGGTGCCTAATGGTAAC

481 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540  
A D L R S K G L N R I G N L L V P N G N -

TACTGTAAGTTCGAGGATTGGATTATCCCAATATTTGACCAAATGTTGAAAGAACAACAAA

541 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600  
Y C K F E D W I I P I F D Q M L K E Q K -

ACAAAGAATGTCTTATGGACACCATCAAAAATAATAGCACGTTTGGGGAAGGAAATTAAT

601 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660  
T K N V L W T P S K I I A R L G K E I N -

**P55**

AACGAGTCTTCATATCTATATTGGGCATATAGGAACAATATTCGGGTCTTCTGCCCCGCC

661 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720  
N E S S Y L Y W A Y R N N I P V F C P A -

TTGACAGACGGATCTCTAGGCGACATGTTCTACTTCCATTCAAGTTACCAATCCTGGTCTG

721 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780  
L T D G S L G D M F Y F H S V T N P G L -

**P53**

GTTGTCGATATCGTACAAGATGTCATAGCGATGGATAATGAGGCTGTGCATGCAAGTCCT

781 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840  
V V D I V Q D V I A M D N E A V H A S P -

CAGAAGACTGGGATAATCATTTTTAGGAGGAGGGTTGCCAAAGCATCACATTTGCAATGCG

841 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900  
O K T G I I I L G G G L P K H H I C N A -

```

      AATATGATGCGTAATGGTGCTGATTACGCTGTTTTTATTAACACCGCACAGGAGTATGAT
901  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
a    N M M R N G A D Y A V F I N T A Q E Y D -
      GGTAGTGATTCTGGTGCTCGTCCTGATGAAGCTGTCTCCTGGGGAAAAATAAGTAGTTCC
961  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
a    G S D S G A R P D E A V S W G K I S S S -
      GGTAAAGCTGTGAAGGTGCATTGTGATGCAACTATTGCATTCCCATTGCTCGTTGCAGAA
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
a    G K A V K V H C D A T I A F P L L V A E -
      ACCTTTGCTGCAAAGAGAGAGAGAAAGCATCTAAAGTCAATGGCTTTTAATTAAGTTGTATG
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
a    T F A A K R E K A S K V N G F *
      TTTGGGTTTGCCGAGAATAAACTTGCAATTATATGTTGTATGCATGTTTATATTATTTG 1200
1201 TGTAGAGTACGTACTCTTTCTTTAAAGTATTTGAGCTTTCAC TAATAAAGTAATATATCT 1260
1261 TTATTTTC 1267
```

**Abb. 7.11: Nukleotidsequenz der DHS-cDNA aus *Petasites hybridus***

```

1  CCGCTCCTTGCCAGCCTAATCTCTAGGCCGTGCTCCTCCTCACCATCGCCGCCGACCACC 60
61  ACATCCACCTGCCGCACCGTCTTAACCGCCACCGCCTGCTTCTCCGCCGTCTACAACCGA 120
    CGAGCTCTTTAAACAGAAGCTTAGACTTGCGGAAP86ATGGGGGAATCTTTGAAACAAGCGGC
121  -----+-----+-----+-----+ 180
b      M  G  E  S  L  K  Q  A  A  -

    GGTGATTGAGAATTTGAGGTCAAGGTCAGTTGTATTCAAGGAATCAGAGAGTTTAGAAGGAACCTTG
181  -----+-----+-----+-----+-----+ 240
b      V  I  E  N  L  R  S  V  V  F  K  E  S  E  S  L  E  G  T  C  -

    TGCTAAAATTCGTGGCTACGATTTCAACAATGGGATTGATTATTCACAGATTCTTAAATC
241  -----+-----+-----+-----+-----+ 300
b      A  K  I  R  G  Y  D  F  N  N  G  I  D  Y  S  Q  I  L  K  S  -

    CATGGCTTCAACTGGATTCCAAGCTTCTAATCTCGGCGACGCTATTGAAACCGTTAATCA
301  -----+-----+-----+-----+-----+ 360
b      M  A  S  T  G  F  Q  A  S  N  L  G  D  A  I  E  T  V  N  Q  -

    AATGCTAGATTGGAGGCTTTCTCATGAACAAGAAACGGAAGATTGCAGTGAAGAAGAGAA
361  -----+-----+-----+-----+-----+ 420
b      M  L  D  W  R  L  S  H  E  Q  E  T  E  D  C  S  E  E  E  K  -

    GAATCCTACATACAGAGAATCTATAAGGTGCAAAATCTTCATAGGGTTCACTTCAAATCT
421  -----+-----+-----+-----+-----+ 480
b      N  P  T  Y  R  E  S  I  R  C  K  I  F  I  G  F  T  S  N  L  -

    CATTTCTCTGGTGTTCGAGACATTATTCGATATTTAGTTCAACATCATATGGTTGATGT
481  -----+-----+-----+-----+-----+ 540
b      I  S  S  G  V  R  D  I  I  R  Y  L  V  Q  H  H  M  V  D  V  -

    AATTGTGACAACAACCTGGTGGTATTGAGGAAGATCTCATAAAATGCCTCGCAGACACATA
541  -----+-----+-----+-----+-----+ 600
b      I  V  T  T  T  G  G  I  E  E  D  L  I  K  C  L  A  D  T  Y  -

    CAGAGGTGAATTTTCTCTACCTGGCGCTGAP56CTTGCGTTCAAAAGGACTAAATCGTATTGG
601  -----+-----+-----+-----+-----+ 660
b      R  G  E  F  S  L  P  G  A  D  L  R  S  K  G  L  N  R  I  G  -

    TAACTTGTTGGTGCCTAATGATAACTACTGTAAGTTTGAAGATTGGATTATACCTATATT
661  -----+-----+-----+-----+-----+ 720
b      N  L  L  V  P  N  D  N  Y  C  K  F  E  D  W  I  I  P  I  F  -

    TGACCAAATGTTGGAAGAACAACAAAGAAATGTATTATGGACACCATCAAAAGTAAT
721  -----+-----+-----+-----+-----+ 780
b      D  Q  M  L  E  E  Q  K  T  K  N  V  L  W  T  P  S  K  V  I  -

    AGCATGTTTGGGGAAGGAAATTAATAACAAGTCTTCATATCTATATTGGGCATATAAGAA
781  -----+-----+-----+-----+-----+ 840
b      A  C  L  G  K  E  I  N  N  K  S  S  Y  L  Y  W  A  Y  K  N  -

    CGATATCCCCGTCTTTTGCCCGGGATTGACAGATGGCTCTCTTGAGACATGTTATATTT
841  -----+-----+-----+-----+-----+ 900
b      D  I  P  V  F  C  P  G  L  T  D  G  S  L  G  D  M  L  Y  F  -

    CCATTCTTTTCGCAGTCCTGGTCTTATTGTGACGTAGTACAGGATATCAGGGCGATTAA
901  -----+-----+-----+-----+-----+ 960
b      H  S  F  R  S  P  G  L  I  V  D  V  V  Q  D  I  R  A  I  N  -

```

CAGTGAGGCTGTACATGCAAACCC**P59****TAGGAAGACCGGGATAATCATTTTAG**GGAGGAGGGCT  
 961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020  
 b S E A V H A N P R K T G I I I L G G G L -  
 TCCAAAGCATCACATTTGCAATGCGAATATGATGCGTAATGGTGC**P58****TGATTACGCTGTTTT**  
 1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080  
 b P K H H I C N A N M M R N G A D Y A V F -  
**CATTAACACTGC**ACAGGAGTTTGACGGTAGTGATTCTGGTGCTCGTCTCTGATGAAGCCGT  
 1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140  
 b I N T A Q E F D G S D S G A R P D E A V -  
 GTCATGGGGGAAAATTCGTGGTTCTGCTAAATCCGTCAAGGTGCATTGTGATGCAACTAT  
 1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200  
 b S W G K I R G S A K S V K V H C D A T I -  
**P87**  
 TGCATTCCCGTTACTTGTTGCAGAAA**CATTTGCTGCAAAGCGAGAGAAATAA**ACTGAGCC  
 1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260  
 b A F P L L V A E T F A A K R E K \*  
 ATGTTCTTGATACACTAACCATTTCATACATATTTGGTGAGGAC**P57****AGTATATTATACGCTCC**  
 1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320  
 1321 **A**AGTTTGACTTTTTCTCGAGGGTGGTCAAATGTAATATGATCGAATCCATAGTTATAATT 1380  
 1381 TCTTTTTTAACCTTATAGATTTGGGAATTTGGTAAAAATTAATCAACAATCTGTTGTATAAG 1440  
 1441 CCTTGATCTAATGTACTCTTGACAGAATCTTGATTGCATTGCATATCAAACCTTCTAGTCT 1500  
 1501 ATTATTTTGTATTCAACATTTTCATATTATTGGTCACAACTAATATATGATTGGTTGA 1560  
 1561 AAT 1563

**Abb. 7.12: Potentielle Promotorsequenzen pflanzlicher *dhs*- und *hss*-Gene (je 464 bp), sowie deren putative TATA-Boxen**

**>potentieller HSS-Promotor aus *Cynoglossum officinale***

```
TCTTGTAGC TACACAATAT ATTTAATTAA TTGAATATCT TGTAAAAATA AAAACTACCA
AGATTCTTAA TATCTAAATA TGCATAATTA TATATCGAGT TGGTTTACCC CCCTGAGCGA
ACCGGGACCG GCTCATTTCT CTTGGCGGCA GGCTTCGGTT CCTGTATACC GGGTCGGGTC
CCGAGTAATC CGGCTCGTGC ACATCACGAA CAACATACAA TATTAGGATA TGTATAATAC
AAATATCCCA ACAGTTTGCA GATCCCTTGT GTTCGTTTCT CTTTCTAAAA TGCGAATCAT
GGGGTGAAT AATAATGCAC ATAAACAATT CCAACGTCCC AATAGTATGC ATAATTGTAT
ATTGAGCTGG TTTACCCCAT GAGGTTGATG GGCAACAATA TAATAGTGAT ACTATTGCTT
AAATTTCCCT CT ATATAATCCC CATGAGTTGT TTGCTAATAG TGTG
```

**>potentieller HSS-Promotor aus *Heliotropium indicum***

```
AGATTCTCAA TATGGTATCA GAGACAGATT CTAGGTCTGG TTATTAAATG TTCACGTGCG
ACCTATGTGC AAGTTTAATT GGATCCTATG TAACCCGTTT GATTTGGGTC TCACTATCAA
TATGTTCTAA GTCACATCTG AGATGGGTAT TATAGGAAAA AAATCTACCA CATACAAATT
TTTTTTAAAA ATTATTGCAT TACTCTTCCC ATTATCATTT AATTTTTTCAA TTAATTTTTG
AATAAAAAACC CAAAATTCTC AATAATATTT CAATTTTATA ATTTTATACT AACTTATTGG
ATTCTAGCCA TCAGACCTCT GTTATGGTAT GGCCATGACC GGGGCAGGAA ATAAATGAGT
GGTCTGGGCC TGGCCAATGA CCAATTTTCG CATGTGACAA AAATCATAGG GGCCTATTTG
TCCTCGTCGT CT ATATAAATG GCGAGAACT CAGTTTTATT CAGC
```

**>potentieller HSS-Promotor aus *Symphytum officinale* (Sterilkultur, 900 bp)**

```
AAATATATTC ATAATTATTG GTATATTTAT ATTTTCTCA AATTAGACTT ATGTTATTCT
AAAATTTTGA ATTCAAACTT CATATATAGA TGACAAGTAA TACACAATAT ATAATCACTA
AACTAACTCT ACTAGTTGAA TATATTTATC CTTGAAATAT ACCATAATAA TGCACATTGA
CAATTATTTT AAGTGTGGAG GAATATCGTT TTGTGAAAAC AATTACTTCA ATAATAATAA
ATTAATATCG AACTAGACCA CAGTGTATTG ATGAACGAAT GAATGGTGGC AGTAATTTTA
TTTTGTAGAA GATATTAGAA ATTATTGTTT GTAAACTAAC AATTTTTTGAT AATTTTATAT
GTTGAGGTAG CTGAACACGT GAGGTTGACG GGTAACAATA AAATAGTTCT ACTGCTCAAA
TTATTTCT GT ATATAAAGGG CATGAGTTAT TCACAATGAA TGTG
```

**>potentieller HSS-Promotor aus *Symphytum officinale* (Garten, 1000 bp)**

```
TTGATGAACG AATGGTGGTA GTAATTTTTT TAGAAGATAT TCTAACAGGT TTAGTCCGGA
AACCAAACGG CCCCTAAGGT CCCGTCTCTA GGAATTCCTC AGAAGATGTA AATCGCGGAC
TGGCGCTCAG ATGGTCAGGG CACATGGGGT TACCCGGTTT ACCACAATAC AGATTGCGTC
TCCGCCACCA GGAGGATTCG AACCCGTACC GAAGCTGGGG TTGCTTGGTC GTTTAGCACT
CATACTATTT ACCAACTGAG CTAGCACCGG GGGACAAACT AGAAGATATT CGAAGTCTAA
TAATATTAGA AATTATTGTT TGTAACATAT CCCTGCAAAC AATTTTTTAT AATTTTATAT
GTTGAGGTAG CTCAACACGT GAGGTTGACG GGTAACAATA AAATAGTTCT GCTGCTCAAA
TTATTTCT CT ATATAATGGG CATGAGTTAT TCACAATGAA TGTG
```

**>potentieller DHS-Promotor aus *Arabidopsis thaliana***

```
AGGAACCAGA ACGGATATTA GAATAGTTGT CATCATCATC ATCAAATCAG TTCTGGATGA
GAATGAAACC TGAGTGTTTT CTCCCAGAAG AACATGAGGT GAAAAGTATA CGTCTCTATA
CATACGTCTT TACATATGGA TGCTGCCAAA GAAGAAGGAA AAGATATACA TATGTCATGA
AATATCTCAG TATCTGTTTG CGTTTATGAG ATTCTTGTGT TGGCAGTTAT AATTCCTTGT
TGTACAAATT GGTGAATAGA AAAGATTTGA TTGATTAAAG TGTTCGAGCA ATAAGAGTGA
TTCCACCAAG CTTTGTGAGT TTGTTGATCA ATAGAAAAAA AAGGAGTAAA ATCGAACGTA
CCGGAACGAA CCGAACCATA CAAATACCGG ATCTTTAATC GCGCCCTACC GTGGAAAATG
ATTCGAATTT ATTAACCGAG TTTAGATTCG GACCAACTC AAAC
```



>potentieller Promotor aus *Senecio vernalis*

TACATTTTGC TAAGCAAAAA ATAAGTTAAT ATGTAATTAG TATATACAAT TTTCTATACA  
 AAATAACATA ATATTAGAAC ATACCTTTTA CAAAATTGTC CAAATGAAAC AAATGTTTAA  
 AAAAAATTAC CTCCGATGTT TAAAAGACTC GTATTTAATG TATATTTAAT GTGTCTAAAC  
 CAATATACAA GATAAAATAT AAGTTTTTTA AATATTATAG CCGATATTGT ATATATTTAA  
 ATTAAAATAA AACTATATAT TATATACATG GTCGGACTGG TTTTTCATGT TAAACCGGAC  
 CGCATTAACC GATTATCAAA TTTTGTGAGAC CGGCCGCCCC GATTTCATC TTTTAAGTCG  
 GCAAAACCGA TCAACATAAC TCGGTTCGAT CGGTTTGGTC CGATTCAACG GTCTATTGTA  
 CCCTCTA**ATA TATATA**AAATA AAAATGCTGA TAGTTTTTAT TTTT

>potentieller Promotor aus *Nicotiana tabacum*

ATTACCTTTA TGGGATTTTT GTATTATGGC TGAGAGGTAC TTTGTTTAGT TTATGATTTG  
 GGTTTTGATG ATTTGAGAAAT TGAGGGCTTA ATTCGTTGTA GGTTGTATTT TAAGTGAGGT  
 GAAATTTGGG TCGGGTGATG GGTTCTTTT AAATGGATCG GGTAATAAAT AAAATGAATC  
 ATTTTAATCT AGTACTGCCA CGTGACACTA TATCCAAAAT AAGAGTATTT TTATTCCAAA  
 GTATGGCGGC AGTCCCATGA ATAACTCAAT AGTATAACGA GTGTATTTTT TGATCATTTT  
 GAAAGTATAT AGTTATATTT GATACTTTGC **ATATATTAA** ATGGATAAGA GATATGGGGA  
 TAGGCCAACA ATTGGTGGAC AACATAGGAG CGAATAGAAA TCGGCCCGTT CGAGAGAGAC  
 CGATTAATTA CATAAATAAA CTTGCGTTTT GAAAACGCAG AAAC

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten:**

Andreas Reimann

Zellweg 11

38678 Clausthal-Zellerfeld

geboren am 02.10.1970 in Clausthal-Zellerfeld

ledig

### **Berufstätigkeit:**

ab 09/2006

Fachreferent für Impfstoffe bei der Firma GlaxoSmithKline GmbH und Co KG

06/2005 – 08/2006

Gastwissenschaftler am Institut für Pharmazeutische Biologie der Technischen Universität Braunschweig

Fertigstellung der Dissertation

01/2000 – 05/2005

Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Pharmazeutische Biologie der Technischen Universität Braunschweig. Anfertigen der Dissertation im Rahmen eines DFG-Projektes

Unterbrechung der Dissertation wegen schwerer Krankheit meiner Lebensgefährtin

07/1999 – 12/1999

Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Mikrobiologie der Technischen Universität Braunschweig in Kooperation mit der Volkswagen AG

### **Studium:**

10/1993 – 06/1999

Studium der Biologie an der Technischen Universität Braunschweig

Schwerpunkte: Mikrobiologie, Biochemie und Zellbiologie  
Studentische Hilfskraft am Institut für Mikrobiologie der  
Technischen Universität Braunschweig  
Anfertigen der Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie  
der Technischen Universität Braunschweig  
Titel der Diplomarbeit: „Untersuchungen zur Biologie von  
*Botrytis cinerea* an Fuchsienpflanzen in Unterglaskulturen“

**Verantwortlichkeiten:**

Betreuer des „Biochemiepraktikums für Pharmazeuten“;  
des „Algenpraktikums für Biologen“;  
des „Mikrobiologischen Einführungspraktikums“;  
des Praktikums „Anreicherung, Isolierung und Identifizie-  
rung von Mikroorganismen“  
Leiter botanischer Exkursionen für Pharmazeuten  
Beschaffung und Vorratshaltung von Chemikalien  
Sprecher der wissenschaftlichen Mitarbeiter am Institut für  
Pharmazeutische Biologie der Technischen Universität  
Braunschweig

**Berufsausbildung**

08/1991 – 06/1993      Ausbildung zum Biologisch-Technischen-Assistenten an  
der Berufsfachschule Dr. von Morgenstern in Braun-  
schweig

**Schulbildung:**

1977 - 1981      Grundschule Zellerfeld  
1981 - 1983      Orientierungsstufe Clausthal-Zellerfeld  
1983 - 1991      Gymnasium Robert-Koch-Schule Clausthal-Zellerfeld